

毛竹丙酮酸磷酸双激酶调节蛋白基因克隆、原核表达及纯化

王超莉, 张智俊, 屈亚平, 王 蕾

(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: 丙酮酸磷酸双激酶调节蛋白(pyruvate, orthophosphate dikinase regulatory proteins, RP)是通过调控丙酮酸磷酸双激酶(pyruvate, orthophosphate dikinase, PPK)参与 C₄ 途径光合碳循环途径。毛竹 *Phyllostachys edulis* 作为一种重要的经济竹种, 分析克隆 RP 基因对于竹类植物光合作用的研究具有重大理论和应用价值。通过逆转录实时聚合酶链式反应(RT-PCR)成功克隆得到毛竹 *PeRP1*, 该基因 cDNA 全长 1 275 bp, 编码 425 个氨基酸; 经生物信息学预测, 该蛋白属于 kinase-PPPase 超家族, 主要含有 UDF 299 保守结构域; 经多序列比对发现毛竹 *PeRP1* 蛋白与 C₃ 植物中 RP1 亲缘关系较近, 而与 C₄ 植物亲缘关系较远。为了研究 *PeRP1* 的蛋白质结构, 我们将 *PeRP1* 蛋白进行原核表达, 利用 Ni-NTA 树脂亲和层析结合分子筛(SEC)层析的方法纯化得到了 *PeRP1* 重组蛋白。SEC 纯化的结果表明: *PeRP1* 蛋白在溶液中主要以多聚体形式存在, 二聚体及单体含量较少, 推测 *PeRP1* 蛋白可能以多聚体形式参与调控 PPK 蛋白。这为今后研究该蛋白的结构与功能打下了良好基础。图 7 参 15

关键词: 植物学; 毛竹; 丙酮酸磷酸双激酶调节蛋白; 基因克隆; 原核表达; 蛋白纯化

中图分类号: S718.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2015)05-0749-07

Cloning, expression and purification of pyruvate, orthophosphate dikinase regulatory proteins from *Phyllostachys edulis*

WANG Chaoli, ZHANG Zhijun, QU Yaping, WANG Lei

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

Abstract: Pyruvate orthophosphate dikinase regulatory protein (PPDK-RP) is a key protein in C₄ photosynthesis and can modified enzyme activity of PPK. For *Phyllostachys edulis*, an important economic bamboo species, cloning PPK-RP gene and studying its functions had vital theoretical value and application for bamboo photosynthesis research. Firstly *PeRP1* was successfully cloned by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and afterward a multiple sequence alignment and phylogenetic analysis was conducted. Then for further study the crystal structure of the *PeRP* protein, the recombinant expression pe-SUMO vectors of *PeRP* were constructed and the protein was expressed in *E. coli* and purified by nickle beads column and size column. Results showed that the *PeRP* gene contained a 1.275 kb open reading frame (ORF) coding a 425 amino acid polypeptide, which contained the typical domain of UDF299 and was predicted as a number of kinase-PPPase superfamily. The multiple sequence alignment and phylogenetic analysis of *PeRP* revealed that *Phyllostachys edulis* was a typical C₃ monocotyledon. Expressed soluble *PeRP1* protein had three forms--polymer, dimmers, and monomers in water solution. These provided a foundation for the structure and function of RP. [Ch, 7 fig. 15 ref.]

Key words: botany; *Phyllostachys edulis*; pyruvate, orthophosphate dikinase regulatory proteins; gene cloning; prokaryotic expression; protein purification

收稿日期: 2014-11-28; 修回日期: 2015-01-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31270715); 浙江省自然科学基金资助项目(LY14C160009)

作者简介: 王超莉, 从事生物技术与种质创新研究。E-mail: 709927765@qq.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

生物的一切物质和能量都来源于光合作用,碳4(C₄)途径是光合作用的一个重要途径,是决定植物产量的关键因素之一。C₄途径是由碳3(C₃)途径进化而来的一种高光效种类。与C₃途径相比,它们具有高光强、高温及低二氧化碳浓度下保持高光效的能力,C₃植物同样具有C₄光合途径中的酶^[1]。丙酮酸磷酸双激酶(pyruvate, orthophosphate dikinase, PPK)是C₄途径的限速酶之一,而丙酮酸磷酸双激酶调节蛋白(PPDK-RP或RP)是调节丙酮酸磷酸双激酶活性的关键酶^[2]。Burrell等^[3]从植物的叶片直接分离得到了RP这个蛋白,但是分离得到的蛋白量比较少,且很不稳定。Burnell和Chastain^[4]首次在玉米*Zea mays*中克隆到了RP基因,在体外获得高表达量的蛋白。植物RP蛋白含有一个长度为299个氨基酸残基的保守结构域UDF299,这个保守结构域在微生物RP中也存在,植物来源的UDF299可以调节PPDK,微生物来源的UDF299主要调节磷酸烯醇丙酮酸合成酶(phosphoenolpyruvate synthetase, PEPS)^[5]。Chastain等^[3,5]研究揭示了RP对PPDK的分子调节机制,即RP可催化PPDK活性部位色氨酸/苏氨酸残基的去磷酸化和磷酸化,从而改变PPDK酶的活性和非活性状态,最终影响植物光合碳循环。Chastain等^[6-7]进一步发现拟南芥*Arabidopsis thaliana*中RP存在RP1和RP2等2种基因编码形式,其中RP1定位于细胞叶绿体,具有蛋白激酶和磷酸酶活性,而RP2主要在细胞质中存在,无磷酸酶功能,仅具有蛋白激酶功能^[6-7]。但迄今为止,由于RP晶体结构尚不清楚,这就造成RP蛋白与PPDK蛋白互作以及不同来源的RP结构和功能关系的研究缺乏结构生物学的直接证据。毛竹*Phyllostachys edulis*是一种重要的经济竹种。本研究主要克隆毛竹RP1基因和预测了RP1基因相关生物信息学分析,同时构建高效原核表达体系,分离纯化稳定的RP1蛋白,拟为毛竹RP1蛋白的空间结构及调节功能、竹类植物光合分子机制的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

材料为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幼嫩叶片。

1.2 研究方法

1.2.1 毛竹幼苗RNA的提取和cDNA的合成 取新鲜、无病虫害竹叶,液氮速冻,研磨成粉末,采用总RNA提取试剂(Trizol)提取试剂盒提取核糖核酸(RNA),利用逆转录试剂盒合成互补脱氧核糖核酸(cDNA)。

1.2.2 *PeRP1*基因的克隆 根据拟南芥的RP1基因序列,检索毛竹表达序列标签(EST)数据库,得到一条同源序列,设计引物:上游BamH I酶切位点引物F 5'-CGGGTACCATGATAAGCGCCAAG和下游Hind III酶切位点引物R 3'-CCCAAGCTTCTAGTACCGTTTTGATATGC(由上海生工生物工程技术有限公司合成)。以毛竹cDNA为模板,聚合酶链式反应(PCR)克隆RP1。

1.2.3 对目的片段进行生物信息学分析 利用DNAMAN软件预测RP基因开放阅读框(ORF),RP蛋白等电点、亲疏水性,并对RP1蛋白同源序列进行多序列比对,用Mega 5.0软件构建了系统发生树分析RP1蛋白进化关系。

1.2.4 *PeRP1*原核表达载体构建 利用BamH I与Hind III限制性内切酶双酶切PCR产物,插入到原核表达载体(pe-SUMO),得到N-末端含有6个His亲和和标签的重组子,热激法将重组子转化到表达细胞*Escherichia coil*(Ril),挑取阳性克隆,进行双酶切和单酶切及测序验证。

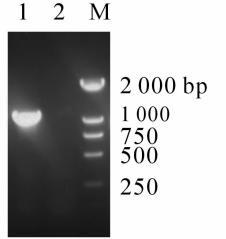
1.2.5 重组*PeRP1*蛋白的可溶性表达及纯化 从抗氨苄平板上挑取单克隆,接入到600.0 μL的LB(Luria-Bertani)培养基中37℃培养过夜,从培养过夜的菌液中以1:100接种到6.0 mL LB培养基,37℃培养,当菌液D(λ)值达到0.6~0.8时,加入终浓度为0.4 mmol·L⁻¹的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG),分别在37℃和20℃条件下诱导。收集菌液,超声破碎,取样,聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测蛋白表达及可溶性情况。将诱导收集的菌体悬浮在25.0 mL裂解液[20.0 mmol·L⁻¹三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl),pH 8.5,200.0 mmol·L⁻¹氯化钠,50.0 g·L⁻¹甘油],超声破碎,4℃,17 500 r·min⁻¹离心,上清转移至镍柱,在冰上用摇床缓慢结合1.0~1.5 h后,分别用不同咪唑浓度梯度的缓冲液(0/20.0/40.0/60.0/80.0 mmol·L⁻¹咪唑,20.0 mmol·L⁻¹三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl) pH 8.5,200.0 mmol·L⁻¹氯化钠)洗脱非特异性结合的杂蛋白,用洗脱液(100.0/200.0/300.0 mmol·L⁻¹咪唑,20.0 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH 8.5,200.0

mmol·L⁻¹ 氯化钠)洗脱目的蛋白。将洗脱的目的蛋白在 10 kDa 浓缩柱中浓缩至 500.0 μL 左右,用于分子筛层析,将浓缩的蛋白上样,收集蛋白,用 SDS-PAGE 检测,将纯度较高的蛋白组份浓缩,-80 °C 保存。

2 结果与分析

2.1 PeRP1 基因克隆

以毛竹 cDNA 为模板,PCR 克隆得到 1 条约为 1.3 kb 的片段(图 1),双向测序拼接后,发现该片段包含 1 个完整的开放阅读框(ORF),长度为 1 275 bp。



1 为目的片段;
2 为参照(ck);
M 为标记物(marker)

2.2 PeRP1 的生物信息学分析

2.2.1 PeRP1 蛋白序列与保守结构域 将 PeRP1 cDNA 序列中 ORF 框概念性翻译成蛋白质氨基酸序列,发现 PeRP1 编码 1 个含有 425 氨基酸残基的蛋白质。此蛋白相对分子质量为 46.28 kDa,等电点为 8.04,第 138~404 氨基酸残基为丙酮酸磷酸激酶调节蛋白的保守区 DUF299(图 2)。

图 1 PeRP1 基因的克隆
Figure 1 Cloning of the PeRP1 gene

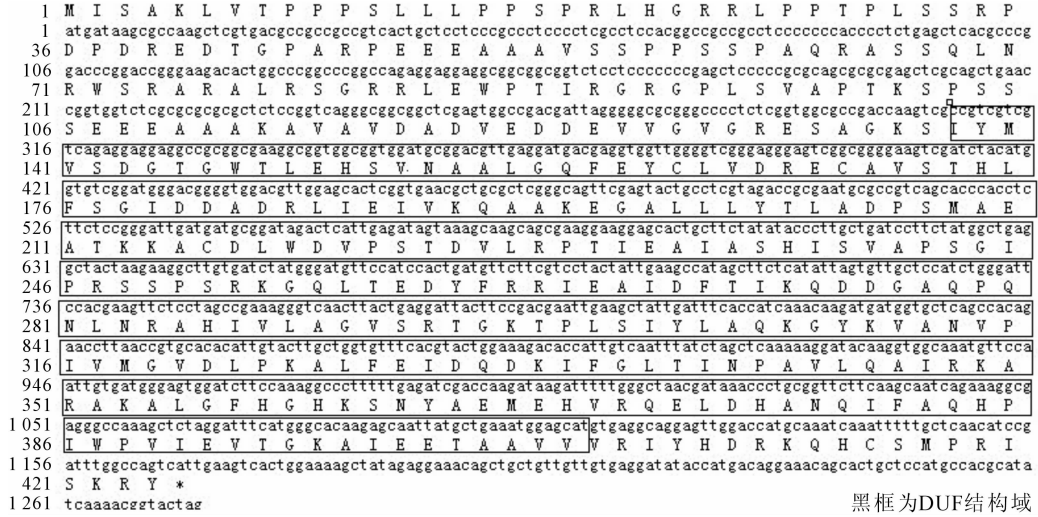


图 2 毛竹 PeRP1 基因开放阅读框及氨基酸序列(图中黑框为 DUF299 结构域)

Figure 2 ORF of PeRP1 gene and the corresponding amino acid sequence

2.2.2 PeRP1 氨基酸序列比对与系统进化树分析 通过对不同植物来源 RP1 进行多序列比对发现,毛竹 PeRP1 编码的蛋白序列与短花药野生稻 *Oryza brachyantha* 的一致性高达 91%,与玉米的一致性达 70%,而与拟南芥的只有 57%,在 DUF299 区序列相似度较高,都属于 kinase-PPPase 超家族(图 3),说明植物 RP1 蛋白结构和功能较为保守。进一步采用 MEGA5 软件构建了基于 PeRP1 编码的氨基酸序列的系统进化树(图 4)。进化树结果表明:系统树明显分为单子叶植物与双子叶植物 2 大分枝,其中单子叶植物分枝中,毛竹与短花药野生稻,乌拉尔图小麦 *Triticum urartu*,二穗短柄草 *Brachypodium distachyon* 位于同一小分枝上,该分枝 RP1 来源于 C₃ 植物,但与单子叶 C₄ 植物及双子叶植物的 RP1 亲缘关系较远,由此可推测毛竹植物光合碳循环可能为 C₃ 植物类型。

2.3 PeRP1 重组蛋白的可溶性表达

将不同片段 PeRP1 重组子转化到表达菌株 *Escherichia coli* (Ril)感受态细胞,异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达后,SDS-PAGE 电泳分析发现(图 5),毛竹 RP1 在 37 °C 和 20 °C 下均有表达,但上清中只有 20 °C 有表达,故在后续实验中确定 20 °C 为重组蛋白诱导表达的最佳条件。

2.4 PeRP1 蛋白 Ni-NTA 纯化

将超声破碎离心后的上清加入 Ni-NTA 柱,带有组氨酸标签的目的蛋白特异性结合到 Ni-NTA 上,

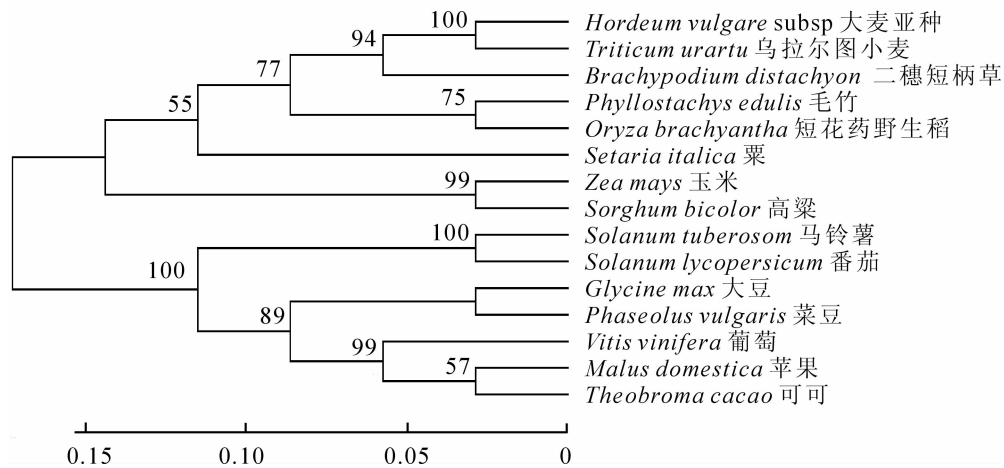
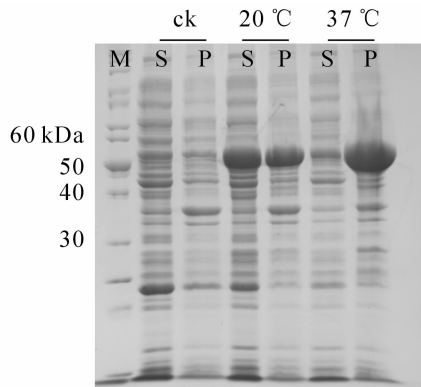


图 4 不同植物 RP1 氨基酸序列构建的分子系统进化树

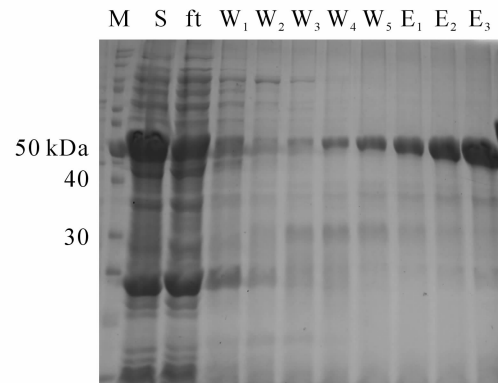
Figure 4 Molecular phylogenetic tree of RP1 from different plants



M为蛋白标记物；ck为未诱导的上清(S)，沉淀(P)；20 °C 诱导的上清(S)，沉淀(P)；37 °C 诱导的上清(S)，沉淀(P)。

图 5 *PeRP1* 在表达菌株 *Escherichia coli* (Ril) 中的表达

Figure 5 Prokaryotic expression of *PeRP1* in *Escherichia coli* (Ril) cells



M为蛋白标记物；S为经诱导破碎离心后的上清；ft为与Ni-beads结合后流下来的液体；W₁, W₂, W₃, W₄, W₅(0/20.0/40.0/60.0/80.0 mmol · L⁻¹咪唑, 200.0 mmol · L⁻¹氯化钠(NaCl), 20.0 mmol · L⁻¹ Tris-HCl pH 8.5); E₁, E₂, E₃(100.0/200.0/300.0 mmol · L⁻¹咪唑, 200.0 mmol · L⁻¹ NaCl, 20.0 mmol · L⁻¹ Tris-HCl pH 8.5)为咪唑梯度洗脱后的 SDS-PAGE电泳结果。

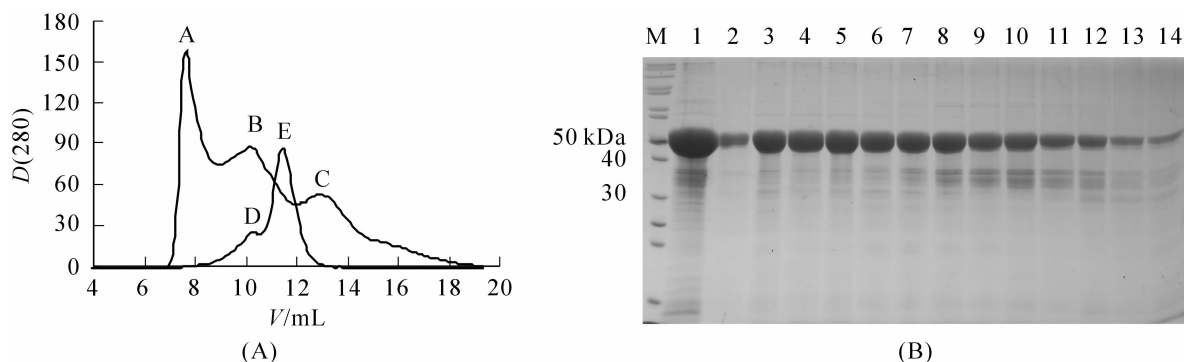
图 6 *PeRP1* Ni-NTA 亲和层析纯化的 SDS-PAG 检测

Figure 6 SDS-PAG analysis from Ni-NTA affinity chromatography of *PeRP1*

结果显示：不同的 RP1 蛋白聚合状态的电泳条带均同 RP1 理论分子量 50 kDa 一致，且蛋白纯度在 95% 左右，说明 RP1 蛋白在溶液中存在多种蛋白聚合体状态，Ni-NTA 结合 SEC 可分离纯化得到不同状态的高纯度 RP1 蛋白，可满足今后蛋白晶体生长的要求。

3 讨论

植物 RP1 作为 C₄ 途径中的一种调节酶，决定了 C₄ 途径光合作用的光合效率，对于植物的产量有重要影响。玉米 RP1 具有 Ser/Thr 激酶和磷酸酶活性，通过对 PPK 调控位点 Thr-456 的氨基酸残基进行可逆磷酸化来调控 PPK 失活(磷酸化)和 PPK 活化(去磷酸化)^[8-10]，该过程是以腺苷二磷酸(ADP)为底物去参加调控反应的^[10-11]。整体而言，RP1 同大多数激酶调节蛋白不同，其具有 3 个显著特征：① RP1 为双功能酶，即该蛋白同时具有蛋白激酶和磷酸酶活性，而大多数调节酶这两个功能是分开的^[12]；



图(A)中: A为PeRP1多聚体吸收峰; B为PeRP1二聚体吸收峰; C为PeRP1单体吸收峰; D为BSA二聚体吸收峰; E为BSA单体吸收峰。图(B)中: M为蛋白标记物(marker); 1为SEC前浓缩样; 2~14为SEC后从7.0 mL开始收集, $0.5 \text{ mL} \cdot \text{个}^{-1}$ 收集的蛋白样品。

图7 PeRP1分子筛层析图(A)及SDS-PAGE检测(B)

Figure 7 Purification of PeRP1 and BSA by size exclusion chromatography (A) and SDS-PAGE of SEC (B)

②催化底物去磷酸化时, 依赖无机磷酸, 生成焦磷酸; ③催化底物磷酸化时, 以ADP为底物, 而不是以ATP作为底物^[10-11], 证明与大多数蛋白磷酸酶通过水解去磷酸化的机制不同^[13]。

本研究首次成功克隆到了毛竹 *PeRP1* 基因, 该基因具有1个完整的开放阅读框(ORF), 编码425个氨基酸。生物信息学分析预测其含有1个保守结构域UDF299, 序列比对发现毛竹RP1与同源RP1都含有这一保守结构域, 属于kinase-PPPase超家族。由于RP1是植物光合碳循环中一个重要的调节蛋白, 结合蛋白序列比对和系统发生树的结果, 毛竹与C₃植物的RP亲缘性较高, 证明C₃植物同样具有C₄途径的酶, 这一结论与唐文莉等^[14]和黄启民等^[15]研究结果相吻合。

从本研究 *PeRP1* 蛋白SEC纯化的结果来看, 毛竹 *PeRP1* 在 $20.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl) pH 8.5, $200.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液条件下, RP1以多聚体、二聚体、单体3种聚体形式存在, 其中多聚体形式所占比例较高, 而这一现象与我们实验室纯化得到的拟南芥 *AtRP1* 蛋白在溶液中只存在二聚体形式有明显不同, 可以推断单子叶毛竹 *PeRP1* 与双子叶拟南芥 *AtRP1* 在结构上可能存在差异, 即毛竹RP1可能是通过二聚体或多聚体形式参与PPDK的调节, 结合分子进化树, 也可推测C₃植物同C₄植物及单子叶同双子叶植物中RP1蛋白空间结构也可能存在差异。SEC中 *PeRP1* 的多聚体究竟是几聚体还需分析超速离心实验(AUC)做进一步验证。本研究在获得较纯的毛竹RP1蛋白后, 也做了后续RP1结晶实验, 但到目前为止一直未获得理想蛋白晶体, 推测毛竹RP1在液体条件下存在不同聚合体状态, 可能直接影响到RP1均一蛋白质晶核的形成。

4 参考文献

- [1] 龚春梅, 宁蓬勃, 王根轩, 等. C₃和C₄植物光合途径的适应性变化和进化[J]. 植物生态学报, 2009, 33(1): 206 - 221.
GONG Chunmei, NING Pengjin, WANG Genxuan. A review of adaptable variations and evolution of photosynthetic carbon assimilating pathway in C₃ and C₄ plants [J]. *Chin J Plant Ecol*, 2009, 33(1): 206 - 221.
- [2] 王真梅, 李海霞, 何莹, 等. 植物丙酮酸磷酸双激酶(PPDK)研究进展[J]. 植物生理学报, 2012, 48(10): 949 - 957.
WANG Zhenmei, LI Haixia, HE Ying, et al. Advances in plant pyruvate, orthophosphate dikinase [J]. *Plant Physiol J*, 2012, 48(10): 949 - 957.
- [3] BURNELL J N, HATCH M D. Dark/light regulation of pyruvate, Pi dikinase in C₄ plants: evidence that the same protein catalyses activation and inactivation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983, 111(1): 288 - 293.
- [4] BURNELL J N, CHASTAIN C J. Cloning and expression of maize-leaf pyruvate, P_i dikinase regulatory protein gene [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(2): 675 - 680.
- [5] TOLENTINO R, CHASTAIN C, BURNELL J, et al. Identification of the amino acid involved in the regulation of bacterial pyruvate, orthophosphate dikinase and phosphoenolpyruvate synthetase [J]. *Adv Biol Chem*, 2013, 3(3A): 12 - 21.

- [6] CHASTAIN C J, XU Wenxin, PARSLEY K, *et al.* The pyruvate, orthophosphate dikinase regulatory proteins of *Arabidopsis* possess a novel, unprecedented Ser/Thr protein kinase primary structure [J]. *Plant J*, 2008, **53**(5): 854 – 863.
- [7] ASTLEY H M, PARSLEY K, AUBRY S, *et al.* The pyruvate, orthophosphate dikinase regulatory proteins of *Arabidopsis* are both bifunctional and interact with the catalytic and nucleotide-binding domains of pyruvate, orthophosphate dikinase [J]. *Plant J*, 2011, **68**(6): 1070 – 1080.
- [8] HART Y, MAYO A E, MILO R, *et al.* Robust control of PEP formation rate in the carbon fixation pathway of C₄ plants by a bifunctional enzyme [J]. *BMC Syst Biol*, 2011, **5**: 171 – 182.
- [9] BURNELL J N, CHASTAIN C J. Cloning and expression of maize-leaf pyruvate, P_i dikinase regulatory protein gene [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **345**(2): 675 – 680.
- [10] CHASTAIN C J, THOMPSON B. Raymond chollet. maize recombinant C₄-pyruvate,orthophosphate dikinase: expression in *Escherichia coli*, partial purification, and characterization of the phosphorylatable protein [J]. *Photosynth Res*, 1996, **49**(1): 83 – 89.
- [11] BURNELL J N. Cloning and characterization of *Escherichia coli* DUF299: a bifunctional ADP-dependent kinase-P_i-dependent pyrophosphorylase from bacteria [J]. *BMC Biochem*, 2010, **11**(1): 1 – 8.
- [12] SMITH R D, WALKER J C. Plant protein phosphatases [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, **47**(1): 101 – 125.
- [13] ASHTON A R, BURNELL J N, HATCH M D. Regulation of C₄ photosynthesis: inactivation of pyruvate, P_i dikinase by ADP-dependent phosphorylation and activation by phosphorolysis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1984, **230**(2): 492 – 503.
- [14] 唐文莉, 彭镇华, 高健. 毛竹 *Phyllostachys edulis* 光系统 I 基因 *LhcaPe02* 全长的克隆与序列分析[J]. 安徽农业大学学报, 2008, **35**(2): 153 – 158.
TANG Wenli, PENG Zhenhua, GAO Jian. Cloning and sequence analysis of a full length gene *LhcaPe02* putative encoding the light harvesting protein in *Phyllostachys edulis* [J]. *J Anhui Agric Univ*, 2008, **35**(2): 153 – 158.
- [15] 黄启民, 杨迪蝶, 高爱新. 毛竹光合作用的研究[J]. 林业科学, 1989, **25**(4): 366 – 369.
HUANG Qimin, YANG Didie, GAO Aixin. A study of photosynthesis of bamboo [J]. *Sci Silv Sin*, 1989, **25**(4): 366 – 369.