

单环刺螠硫醌氧化还原酶相互作用蛋白质的筛选

谭志^{1,2}, 马玉彬¹, 邵明瑜¹, 张志峰¹

(1. 中国海洋大学 海洋生物遗传育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 青岛农业大学 继续教育学院, 山东 青岛 266109)

摘要: 硫化物是沿海水域中常见的有害物质, 对于多数生物来讲, 其在微摩尔级水平便可导致生物体中毒。硫醌氧化还原酶(SQR)是一种谷胱甘肽还原酶家族的膜结合黄素蛋白, 为硫化物氧化解毒的一种关键酶。本研究以体外原核表达并复性的单环刺螠 SQR 为材料, 采用 His-pulldown 技术和 SDS-PAGE 分析, 从单环刺螠体壁细胞裂解液中筛选出两个可能与 SQR 结合的蛋白质, 分子质量分别为 40 ku 和 60 ku。通过毛细管液相色谱-离子阱质谱分析, 初步判断其为细胞色素 P450(cytochrome P450)和腺苷三磷酸结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette transporter), 并初步探讨了其可能的功能。

关键词: 单环刺螠; 硫醌氧化还原酶; His-pulldown; 质谱

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)08-0060-05

硫化物对于多数生物的毒害作用表现在: 它可以抑制线粒体电子传递链细胞色素氧化酶的活性^[1], 从而阻止有氧呼吸的进行, 进而导致生物体的死亡。近年来, 人们发现一些沿岸底栖生物具有耐受和代谢硫化物的能力, 并推测一种类似于细菌硫醌氧化还原酶(Sulfide: quinone oxidoreductase, SQR)的蛋白参与这一过程^[2], 有毒的硫化物可在其催化下被氧化形成硫代硫酸盐或亚硫酸盐等低毒或无毒的产物, 此氧化过程中产生的电子通过泛醌进入氧化呼吸链, 最终参与 ATP 的合成, 提供有机体能量^[3,4]。SQR 的功能及作用原理最早在原核生物中被阐述, 对于真核生物, Vande Weghe 等^[5]于 1999 年首次在粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中得到该酶的基因序列并对其蛋白定位和酶特性进行了研究。2008 年 Ursula Theissen 等^[6]首次在多细胞真核生物沙蠋中利用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)表达系统获得了具有活性的 SQR, 并进一步对其酶活性及保持酶活性所必需的几个保守的氨基酸进行了研究, 然而有关与 SQR 相互作用的上下游分子的研究, 目前尚未见报道。

单环刺螠(*Urechis unicinctus*), 俗称海肠子, 隶属于螠虫动物门(Echiuroidea), 刺螠属(*Urechis*), 为东亚地区沿海泥沙岸潮间带下区及潮下带浅水区中生存的底栖生物^[7]。对于单环刺螠硫代谢相关领域的研究, 目前已在组织细胞学特性^[8]、体腔液中血红素的组成^[9]以及呼吸代谢酶活性^[10]等方面有了报道。本

研究使用本实验室已体外原核表达并获得的具有活性的带有六聚组氨酸标签的单环刺螠 6His-SQR, 采用 His-pulldown 技术和毛细管液相色谱-离子阱质谱技术, 筛选和初步定性了与单环刺螠 SQR 相互作用的蛋白质, 为深入探讨单环刺螠硫化物代谢机制提供研究资料。

1 材料与方法

1.1 材料

单环刺螠购自青岛市四方路海产品市场; *Escherichia coli* BL21(DE3)菌株、pET-28a 载体均由本实验室保存; Ni²⁺-NTA His-Bind Resins 购自 Novagen 公司; 辅酶 Q₂ 购自 Sigma 公司; 色谱级乙腈(acetonitrile)、甲酸购自美国 Fisher 公司; 测序级胰蛋白酶(Trypsin)购自美国 Roche 公司; 其余试剂均为国产分析纯以上。

1.2 方法

1.2.1 单环刺螠 6His-SQR 的诱导表达及纯化

含单环刺螠 *sqr* 全长 cDNA 的阳性菌株在含卡纳霉素(30 mg/L)的 LB 培养基中加入诱导剂异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(Isopropyl-β-D-thiogalactopyr, IPTG)

收稿日期: 2009-11-16; 修回日期: 2010-03-30

基金项目: 国家自然科学基金面上项目资助 (40776074)

作者简介: 谭志(1982-), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 研究方向: 遗传学, 电话: 13583287554, E-mail: brive_zhi@163.com; 张志峰, 通信作者, 电话: 0532-82031647, E-mail: zzfp107@ouc.edu.cn

至终浓度 1 mmol/L, 37 °C, 诱导表达 5 h 后, 4 °C, 2 655 g 离心 10 min 收集菌体, 用 20 mL PBS 重悬, 在冰浴中超声破碎, 直到溶液变澄清。于 4 °C、15 294 g 离心 10 min, 收集沉淀即得包涵体形式的 6His-SQR。

取包涵体溶于变性液(8 mol/L 尿素, 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 0.1 mol/L 磷酸钠, 1 mmol/L β -巯基乙醇)中, 4 °C 溶解过夜, 离心收集上清。透析去除 β -巯基乙醇, 用 Ni^{2+} -NTA 纯化 6His-SQR 蛋白, 收集洗脱液。SDS-PAGE 分析鉴定洗脱液蛋白组分。Brandford 法检测蛋白含量后, -20 °C 保存备用。

1.2.2 单环刺螈 6His-SQR 复性及酶活测定

4 °C 下, 将蛋白洗脱液滴加至复性缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 5 mmol/L 还原型谷胱甘肽(Reduced glutathione, GSH), 0.5 mmol/L 氧化型谷胱甘肽(Oxidized glutathione, GSSG), 0.4 mol/L L-精氨酸, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF), 蛋白浓度 50 mg/L)中, 静置 24 h 使之充分复性。然后 15 294 g 离心 20 min, 上清液中可溶蛋白组分即为复性成功的蛋白。Brandford 法检测可溶组分的蛋白含量。

室温下, 0.3 mL 反应液中依次加入 0.02 mol/L Tris(pH 8.0), 100 $\mu\text{mol/L}$ 辅酶 Q_2 , 0.5 μg SQR, 400 $\mu\text{mol/L}$ 硫化物(使用液氮新鲜处理的水配制)。硫化物加入后开始计时, 记录 3 min 内辅酶 Q_2 在 $\text{OD}_{285 \text{ nm}}$ 的降低值^[5,6]。SQR 比活值($\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$) = $\Delta\text{OD}_{285} \times A/(B \times C \times D)$ 。公式中 A 为反应液总体积 0.3 mL, B 为 1 μmol 辅酶 Q_2 的摩尔消光系数 0.00885, C 为 SQR 量 0.5 μg , D 为反应时间 3 min。酶活测定重复 3 次。

1.2.3 透析法浓缩复性后的单环刺螈 6His-SQR 蛋白

将稀释复性后的蛋白液放入透析袋内, 将聚乙二醇 8 000(Polyethylene Glycol 8000, PEG8000)均匀撒在透析袋外, 4 °C 放置。待 PEG 完全吸水变为黄色时, 再次在透析袋外均匀洒上 PEG, 直至 6His-SQR 浓缩至浓度为 1 g/L。采用 1.2.2 的方法检测浓缩后蛋白的酶活性。

1.2.4 His-pulldown 实验

根据预实验结果, 取复性蛋白(1 g/L)与 Ni^{2+} -NTA 树脂, 于 4 °C 下缓慢旋转结合 1 h, 将结合有 SQR 的树脂 4 °C 放置备用; 解剖取单环刺螈体壁组织, 用细胞裂解液(50 mmol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, 0.1%(m/v)SDS, 0.75%(v/v)NP-40, 1 mmol/L EGTA, 0.5%(m/v) 脱氧胆酸钠, 100 mg/L PMSF)冰上匀浆, 4 °C 12 000 g 离心 10 min 得上清蛋白液, Brandford 法

测定蛋白浓度后, 储存于冰箱中备用。取单环刺螈体壁组织细胞裂解液与结合有单环刺螈 6His-SQR 的 Ni^{2+} -NTA 树脂, 于 4 °C 下缓慢旋转结合 1 h, 收集过柱流出液, 用 Bindbuffer, Washbuffer I, II, Elution buffer 依次洗脱树脂, 并分别收集过柱流出液, 所得流出液进行 12% SDS-PAGE 分析。

1.2.5 质谱分析

将上述分离的蛋白质条带从凝胶上切割下来, 置于 1.5 mL Eppendorf 管中, 用脱色液(50%(v/v)乙腈和 25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液, 按照 1 : 1 混合)在涡旋混合器上震荡约 30 min(37 °C), 倒掉脱色液, 然后重复上述操作直至蓝色完全褪净。经乙腈脱水后, 置于真空干燥机内干燥至胶粒跳起(约 20 min), 50 μL 0.1 g/L 的胰蛋白酶液 4 °C 放置 15 min 吸胀胶块后, 吸出多余胰酶, 加入 50 μL 25 mmol/L 的 NH_4HCO_3 溶液保湿, 37 °C 酶解 18 h。离心收集酶解后的上清液, 加入 10 μL 50%乙腈和 2.5%(v/v)三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)的混合液 30 °C 放置 1 h 后萃取上清液, 重复 1 次, 收集合并酶解液, 将合并得到的酶解液体冷冻干燥后, 采用毛细管液相色谱-离子阱质谱仪(Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA)进行质谱分析^[11,12]。用 Bioworks software 和 SEQUEST 软件采集质谱数据并进行数据分析。

2 结果

2.1 单环刺螈 6His-SQR 体外表达蛋白的纯化

体外重组的 pET28a-SQR/BL21(DE3)菌, 在 1.0 mmol/L IPTG 诱导 5 h 后获得表达产物, 经 Ni^{2+} -NTA 柱纯化后, 得到目的蛋白, 分子质量约为 50 ku, 与预期的 SQR 蛋白大小一致(图 1)。

2.2 His-pulldown 实验

通过稀释法复性单环刺螈 6His-SQR 蛋白, 并按照 1.2.2 的方法测得该酶的比活值为 5.04 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。通过预实验确定了使 1 mL Ni^{2+} -NTA 树脂饱和结合单环刺螈 6His-SQR 的蛋白量为 3 mg。图 2 中泳道 2 和 3 分别为单环刺螈 6His-SQR 与 Ni^{2+} -NTA 树脂结合前后的电泳结果, 显示 Ni^{2+} -NTA 树脂上已成功结合 6His-SQR 蛋白; 通过 Bindbuffer 平衡树脂后, 使用 pH 顺次降低的 washbuffer 将结合在 Ni^{2+} -NTA 树脂上的非特异性蛋白质洗脱下来, 最后

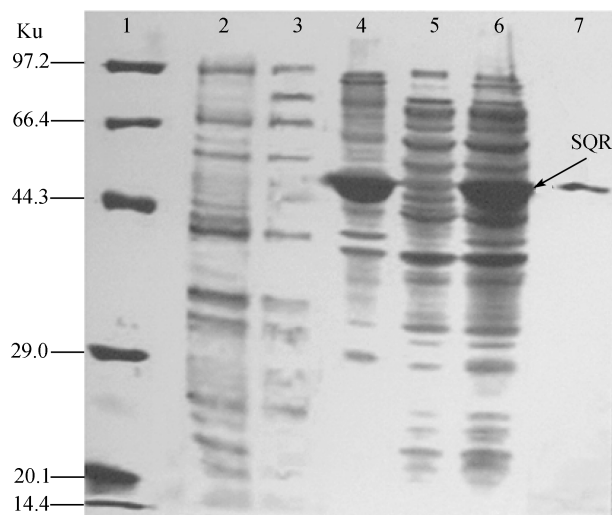


图 1 单环刺螭 6His-SQR 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the *U. unicinctus* SQR recombinant protein

1. 蛋白分子量标准; 2. 未诱导 pET28a-BL21(DE3) 菌; 3. 未诱导 pET28a-SQR-BL21(DE3) 菌; 4. 诱导 pET28a-SQR-BL21(DE3) 5 h 后总蛋白; 5. 诱导 pET28a-SQR-BL21(DE3) 5 h 后上清; 6. 诱导 pET28a-SQR-BL21(DE3) 5 h 后沉淀(箭头示包涵体); 7. Ni^{2+} -NTA 柱纯化后蛋白
1. protein markers; 2. pET28a-BL21(DE3) before induction; 3. pET28a-SQR-BL21(DE3) before induction; 4. protein expression of pET28a-SQR-BL21(DE3) induced by IPTG for 5 h; 5. supernatant of ultrasonicated product of pET28a-SQR-BL21(DE3) induced by IPTG for 5 h; 6. inclusion body (arrow) of ultrasonicated product of pET28a-SQR-BL21(DE3) induced by IPTG for 5 h; 7. target protein purified by Ni^{2+} -NTA.

使用 Elution buffer 将特异性结合在 Ni^{2+} -NTA 树脂上的 SQR 及与 SQR 结合的蛋白(条带 A 和 B)一起洗脱下来(图 2 泳道 9), 条带 A 和 B 为单环刺螭组织细胞裂解液中可能存在的两个与 SQR 结合的蛋白质, 它

们的分子质量约为 60 ku 和 40 ku(图 2)。

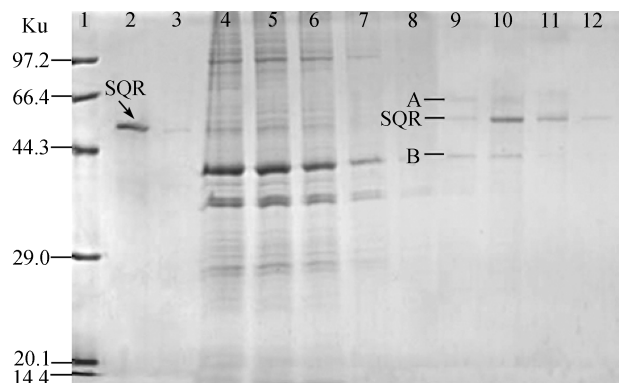


图 2 单环刺螭 SQR His-pulldown 分析
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the *U. unicinctus* SQR His-pulldown result

1. 蛋白分子量标准; 2. 纯化的 6His-SQR 蛋白; 3. 6His-SQR 蛋白与 Ni^{2+} -NTA 柱结合之后的过柱流出液; 4. 单环刺螭体壁细胞裂解液; 5. 单环刺螭体壁细胞裂解液的过柱流出液; 6. pH8.0 Bindbuffer 洗涤树脂之后的过柱流出液; 7~8. pH6.3 和 pH5.9 Washbuffer 洗涤后的过柱流出液; 9~12. pH4.5 Elution buffer 第 1~4 次洗涤后的过柱流出液(A 和 B 示可能的结合蛋白)。
1. protein markers; 2. purified 6His-SQR protein; 3. the flow-out after 6His-SQR protein binding with Ni^{2+} -NTA resins; 4. the cell lysis solution of *U. unicinctus* body wall; 5. the elution after the cell lysis of *U. unicinctus* binding with Ni^{2+} -NTA resins; 6. the elution by pH8.0 Bindbuffer; 7~8. the elutions by Washbuffer at pH6.3 and pH5.9; 9~12. the 1th ~4th elution by pH4.5 Elution buffer(A and B indicate the pulled-down proteins).

2.3 质谱分析

His-pulldown 实验所得的两个蛋白条带, 经质谱分析, 初步确定其为: 细胞色素 P450 和腺苷三磷酸结合盒转运蛋白(表 1)。

表 1 与 6His-SQR 重组蛋白相互作用蛋白的毛细管液相色谱-离子阱质谱分析

Tab. 1 Ion-trap Mass spectrometer analysis of proteins interacting with the recombinant 6His-SQR protein

蛋白名称	收录编号	相对分子质量(ku)	等电点	质谱测得氨基酸序列	分值	相关功能
细胞色素 P450	AAY90143	61.38	8.68	RVAHATVR	10.06	单加氧酶活性 还原酶活性 氧化酶活性
腺苷三磷酸结合盒 转运蛋白	NP_107545	36.24	11.28	RAIQIAMPVGFGR	10.08	物质转运功能

3 讨论

生物体的大部分生命活动发生在蛋白质水平, 虽然有一些蛋白质可以以单体的形式发挥作用, 但大部分蛋白质都是和伴侣分子一起作用或是与其他蛋白质形成复合物来发挥作用的。因此, 研究蛋白质相互作用是更好地理解生物的各种生命活动的重要

手段之一。本实验选择适宜大分子量蛋白质的六聚组氨酸作为标签, 构建了单环刺螭 SQR 六聚组氨酸蛋白, 并以此为饵蛋白, 采用 His-pulldown 技术, 从单环刺螭体壁组织液中钓取了两个与该蛋白相互作用的蛋白质。为了消除假阳性对实验结果的干扰, 我们确定了 Ni^{2+} -NTA 树脂与单环刺螭 6His-SQR 结合的饱和度, 从而有效地避免了实验的假阳性问题。

相对于整个蛋白质表面而言,蛋白质间相互作用位点上含有大量的输水氨基酸残基,因此有人认为两个蛋白质的结合可能来自于输水性表面区域的包埋。通常,接触面中的 Leu、Ile、Val、Phe、Tyr 和 Met 含量丰富^[13,14]。本研究通过对 pulldown 钓取的两个蛋白质的质谱分析,初步定性它们为细胞色素 P450 和腺苷三磷酸结合盒转运蛋白。已知细胞色素 P450 主要定位在内质网膜和线粒体膜上^[15],并且根据该蛋白的三维结构分析^[16],其分子表面露出的氨基酸残基含有 Phe 和 Leu 等疏水性氨基酸残基,据此推测细胞色素 P450 可能与 SQR 表面的疏水性氨基酸残基通过疏水键相互结合。再有,细胞色素 P450 在真核生物中具有(1)单加氧酶活性:使烷基碳羟化和芳香环环氧化、烷氧基的去烷基等;(2)氧化酶活性:使芳香环羟基化、苯二酚氧化成醌等;(3)还原酶活性:使偶氮化物还原性裂解为两分子胺、使硝基还原为氨基、使醌还原成半醌、使卤代烃脱卤素等^[17]。由此推测二者的相互作用可能在硫化物的氧化半反应中起到电子传递的作用。腺苷三磷酸结合盒转运蛋白超家族是一组跨膜蛋白,具有 ATP 结合区域的单向底物转运泵,以主动转运的方式完成多种分子的跨膜转运,该蛋白的核心结构包括核苷酸结合域和跨膜结构域,这种跨膜结构域是高度疏水的^[18,19],因而推测该蛋白可能通过该结构域与 SQR 形成疏水性相互作用,据此推测该蛋白在硫化物解毒的过程中可能具有将酶反应过程中产生的代谢物质转运到线粒体外的作用。上述推测需要进一步的研究加以证明。

致谢:感谢中国科学院实验海洋生物学重点实验室的肖鹏老师在质谱实验中给予的帮助。

参考文献:

- [1] Nicholls P. The effect of sulfide on cytochrome aa3. Isosteric and allosteric shifts of the reduced a-peak[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1975, 396: 24-35.
- [2] Völkel S, Grieshaber M K. Sulphide oxidation and oxidative phosphorylation in the mitochondria of the lugworm *Arenicola marina*[J]. *J Exp Biol*, 1997, 200: 83-92.
- [3] Arieli B, Padan E, Shahak Y. Sulfide-induced sulfide-quinone reductase activity in thylakoids of *Oscillatoria limnetica*[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266: 104-111.
- [4] Schüetz M C, Klughammer C G, *et al.* Sulfide-quinone reductase activity in membranes of the chemotrophic bacterium *Paracoccus denitrificans* GB17[J]. *Arch Microbiol*, 1998, 170: 353-360.
- [5] Vande Weghe J G, Ow D W. A fission yeast gene for mitochondrial sulfide oxidation[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 13 250-13 257.
- [6] Theisse U, Martin W. Sulfide:quinone oxidoreductase(SQR) from the lugworm *Arenicola marina* shows cyanide-and thioredoxin-dependent activity[J]. *FEBS J*, 2008, 275: 1 131-1 139.
- [7] 李凤鲁,王玮,周红. 黄渤海蠕虫动物(蠕虫动物门)的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1994, 24(2): 203-210.
- [8] Zhang Z F, Shao M Y, Kang K H, *et al.* Studies on the tolerating mechanism for sulfide in *Urechis unicinctus* (Echiura: Urechidae)—cytological observation on *Urechis unicinctus* in different hydrogen sulfide environment [J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2003, 21(1): 86-90.
- [9] Ma Z J, Bao Z M, Zhang Z F, *et al.* The changes of three components in coelomic fluid of *Urechis unicinctus* exposed to different concentrations of sulfide [J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2005, 23(1): 104-109.
- [10] 张志峰,王思锋,霍继革,等. 单环刺螠对硫化物暴露的呼吸代谢适应[J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(4): 639-644.
- [11] 齐小城,章弘扬,梁琼麟,等. 液质联用技术及其在代谢组学研究中的应用[J]. 中成药, 2009, 31(1): 106-112.
- [12] Greenbaum D, Baruch A, Hayrapetian L, *et al.* Chemical approaches for functionally probing the proteome [J]. *Mol Cell Proteomic*, 2002, 1(60): 60-68.
- [13] 李永勤,王胜军,李志杰,等. 预测蛋白质相互作用位点的计算方法研究(一)[J]. 中国医学物理学杂志, 2006, 5(23): 345-350.
- [14] Lijnzaad P, Argos P. Hydrophobic patches on protein subunit interfaces: characteristics and prediction[J]. *Proteins*, 1997, 28: 333-343.
- [15] 赵博,王中伟. 细胞色素 P450 的研究进展 [J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2004, 35(1): 142-144.
- [16] Dai R, Pincus M R, Friedman F K. Molecular modeling of Cytochrome P450 2B1: Mode of membrane insertion substrate specificity[J]. *Journal of Protein Chemistry*, 1998, 17(2): 121-129.
- [17] 王夔. 生命科学中的微量元素[M]. 第二版. 北京: 中国计量出版社, 1996. 279-284.
- [18] 王华丙,张振义,包锐,等. ABC 转运蛋白的结构与转运机制[J]. 生命的化学, 2007, 27(3): 208-210.
- [19] Elie D, Bouige P. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms [J]. *Res Microbiol*, 2001, 152: 211-229.

Screening proteins interacting with sulfide:quinone oxidoreductase(SQR) of *Urechis unicinctus*

TAN Zhi^{1,2}, MA Yu-bin¹, SHAO Ming-yu¹, ZHANG Zhi-feng¹

(1. Key Laboratory of Marine Genetic Breeding of Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. School of Continuing Education, Qingdao Agricultural University, Qingdao, 266109, China)

Received: Nov., 16, 2009

Key words: *Urechis unicinctus*; sulfide:quinone oxidoreductase; His-pulldown; mass spectrometer

Abstract: Sulfide is toxic to most aerobic organisms, even fatal at a level of $\mu\text{mol/L}$ to some organisms. Sulfide:quinone oxidoreductase (SQR), a membrane-bound flavoprotein of glutathione reductase family, is a key enzyme for sulfide oxidation detoxification. In this study, *Urechis unicinctus* SQR was expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies, and obtained active proteins by dilution refolding. Two probable SQR-binding proteins, which were of 40 and 60 ku respectively, were screened from the cell lysis solution of *U. unicinctus* body wall by His-pulldown technology and SDS-PAGE analysis, and preliminary determined as cytochrome P450 (cytochrome P450) and adenosine triphosphate-binding cassette transporter (ATP-binding cassette transporter) by mass spectrometer analysis. Probable functions of the two proteins were discussed.

(本文编辑: 康亦兼)

(上接第 49 页)

Survey and assessment of seawater quality at Dagou river estuary and adjacent sea area

HAN Bin¹, CAO Lei², LI Pei-chang¹, CHEN Fa-rong¹, SONG Zhuan-ling¹, WANG Xiao-ru¹

(1. First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Received: Sep., 15, 2009

Key words: Jiaozhou Bay; Dagou river estuary; water quality; survey and assessment

Abstract: The survey of surface seawater quality at the Dagou river estuary and adjacent sea area was conducted in June, 2006 and 2007, in which temperature, pH value, salt degree, DO, COD, $\text{NH}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$, Cu, Pb, Zn, Cd and oils were measured. The sea water quality was assessed by analysing the single pollution index and the nutrient status index. The main pollutants were inorganic nitrogen and oils. The nutrient level was relatively high at Dagou river estuary and adjacent sea area. It belonged to a phosphorus-limiting sub-eutrophication status in 2006 and 2007.

(本文编辑: 康亦兼)