长牡蛎电压门控钙离子通道 β 亚基的无标签亲和层析纯化

刘凤华^{1,2,3}, 王 淏^{1,3}, 贾乔雅^{1,3}, 毕允晨^{1,2,3}

(1. 中国科学院海洋研究所 中国科学院海洋大科学研究中心,中国科学院和山东省实验海洋生物学重点实验室,山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学,北京 100049; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋 生物学与生物技术功能实验室,山东 青岛 266237)

> 摘要:亲和层析是一种广泛使用的蛋白质分离纯化技术,常用的亲和标签包括谷胱甘肽巯基转移酶 (GST)标签、麦芽糖结合蛋白(MBP)标签、多组氨酸(polyhistidine)标签等。然而,外源亲和标签可能会 影响蛋白质的结构与功能,通常需要酶切去除,造成实验流程加长、产率降低。某些蛋白质具有与亲 和标签相似的氨基酸序列特征,利用这种序列特征尝试无标签纯化可有效避免上述问题。本研究选取 C端天然富含组氨酸残基的长牡蛎电压门控钙离子通道(VGCC)β亚基进行无标签亲和层析纯化,结果 显示,氨基三乙酸镍(Ni-NTA)能够特异性地结合无标签的β亚基,且结合能力与多组氨酸标签相当。 对β亚基C端组氨酸残基分组突变后发现,随着组氨酸残基突变的增多,各突变型β亚基与Ni-NTA 的结合能力逐步下降。免疫印迹实验结果表明,β亚基C端(HG)7序列在针对多组氨酸标签的抗体识别 中发挥关键作用。VGCCβ亚基的这种天然序列特征也可应用于该膜蛋白复合体提取过程关键步骤的 监测。综上,本研究对氨基酸序列中具有亲和标签特征的蛋白质进行了无标签亲和层析纯化,为具有 相似特征蛋白质的分离纯化提供了参考。

关键词:电压门控钙离子通道;β亚基;蛋白纯化;亲和层析;多组氨酸
中图分类号:Q816 文献标识码:A 文章编号:1000-3096(2022)02-0087-10
DOI:10.11759/hykx20211231003

蛋白质是维持细胞结构和功能完整的生物大分 子,许多疾病的发病机制均与关键蛋白质的错误折 叠、功能紊乱相关^[1-2]。因此,蛋白质相关研究是生 物学和医学等领域的重要研究方向^[3],获得高纯度 的蛋白质是首要和关键步骤。常用的蛋白质分离纯 化方法有等电点沉淀^[4]、离子交换层析^[5]、分子排阻 层析^[6]、亲和层析^[7]、疏水作用层析^[8]、电泳^[9]等。 其中,亲和层析具有特异性高、稳定性好、成本低等 优点^[10],是蛋白质分离纯化的首选方法。

亲和标签是一些对特定的生物或化学配体具 有高度亲和力的多肽,选择合适的亲和标签将其融 合到目的蛋白的 N 端或 C 端^[11],并与相应的载有固 定化配体的亲和柱配合使用,能在未去除核酸或其 他细胞组分的情况下将目的蛋白的纯度提升数百 倍甚至数千倍^[12]。亲和标签与亲和柱的结合往往是 可逆的,洗脱条件也比较温和,对纯化条件敏感的 蛋白质以及蛋白质复合体尤为适用^[12]。目前,常用 的亲和标签有多组氨酸(polyhistidine)标签, Flag 标 签,谷胱甘肽巯基转移酶(GST)标签,链霉亲和素 结合肽(SBP)标签,麦芽糖结合蛋白(MBP)标签等 等。需要注意的是,虽然部分亲和标签可以增加重 组蛋白的溶解性、提高产量、甚至在一定条件下促 进蛋白折叠^[13],但亲和标签尤其是分子量较大的亲 和标签也容易给目的蛋白的结构与功能带来不利 因素,影响下游应用^[14]。以GST标签为例,它是一 种天然存在于真核细胞中发挥重要作用的转移酶, 与目的蛋白融合后能提高重组蛋白溶解性,但该标 签的分子量较大(约 26 kDa)且容易形成同型二聚 体,可能影响重组蛋白功能,需要通过酶切的方式 去除^[15],去除后常残留额外的氨基酸残基并伴随样

收稿日期: 2021-12-31; 修回日期: 2022-01-05

基金项目:青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室引进人才支持计划项目(YJ2019NO03)

[[]Foundation: Talent Program from Marine Biology and Biotechnology Laboratory, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, No. YJ2019NO03]

作者简介:刘凤华(1997—),女,山东济南人,硕士研究生,主要从 事海洋生物学研究, E-mail: liufenghua19@mails.ucas.ac.cn;毕允晨 (1982—),通信作者,男,研究员,电话: 0532-82893630, E-mail: yunchenbi@qdio.ac.cn

品损失[16]。因此,低分子量标签受到了一些研究者 的青睐^[3, 17]。最常用的低分子量标签是多组氨酸标 签,固定化的 Co²⁺、Cu²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺、Ca²⁺和 Fe³⁺ 均可与多组氨酸标签融合蛋白结合,其亲和作用有 赖于组氨酸的咪唑基与金属离子的配位作用^[18-19]。 然而,多组氨酸亲和标签也存在诸多问题,如影响 重组蛋白的热稳定性^[20],降低重组蛋白活性^[21]等。

马晓川等^[22]对 PDB 数据库中蛋白质的分析结果 显示, 天冬氨酸和谷氨酸的羧基、组氨酸的咪唑基以 及半胱氨酸的巯基较多地参与了同金属离子的配 位。这些氨基酸多为极性氨基酸,一般分布在蛋白质 的表面,并目上述一种或几种氨基酸可在某些蛋白 质特定结构域富集^[23-24]。目前,可以利用特定氨基酸 与金属离子结合能力进行纯化的蛋白通常含有极为 丰富的组氨酸, histidine rich protein 2 (Plasmodium falciparum)即属此类,该蛋白共有 326 个残基,其中 组氨酸残基 112 个,占 34.4%^[25-27]。除上述报道外, 少见基于蛋白质天然序列的无标签纯化。综上,本研 究借助固定相金属离子亲和层析对 C 端富含组氨酸 残基的长牡蛎(Crassostrea gigas)电压门控钙离子通 道(VGCC) β亚基进行了无标签亲和层析纯化, 通过 多个组氨酸突变体的构建进一步确定了该纯化方法 的序列基础,并利用天然 6 亚基的这种序列特性,辅 助了 VGCC 蛋白复合体的原位提取关键步骤的监测,

表1 PCR 引物序列

Tab. 1	The	primer	sequence	for	PCR
--------	-----	--------	----------	-----	-----

为具有相似特征的蛋白纯化提供了参考。

材料与方法 1

1.1 序列分析

基于 NCBI 的非冗余蛋白序列数据库, 对长牡蛎 电压门控钙离子通道 B 亚基的氨基酸序列进行搜索. 并下载该蛋白在部分软体动物、模式动物中的同源 序列进行多序列比对分析。多序列比对借助 BioEdit 软件^[28]完成, 然后通过 EMBOSS Needle(版本 6.6.0) 计算各同源序列与长牡蛎电压门控钙离子通道 β 亚 基氨基酸序列的相似性[29]。

1.2 基因序列获取

以长牡蛎为实验动物对其闭壳肌进行分离,研 磨后, 使用 Invitrogen 的 TRIzol[™] Reagent 提取总 RNA。接着,用Vazyme公司的反转录试剂盒HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)将 得到的总 RNA 反转录成 cDNA, 并以此为模板选用 引物 B1-F、B1-R(表 1)进行 PCR 扩增。随后, 使用 Vazyme 公司的 5 min TM TA/Blunt-Zero Cloning Kit 将 PCR 产物连接到 pCE2 载体中。取适量连接产物 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 涂布平板后 37 ℃ 培养过夜,挑取单菌落进行 DNA 测序鉴定获得阳性 克隆。

140.1 11	e primer sequence for TCK
引物名称	引物序列(5'-3')
B1-F	GGGACGGTAGAACAAGGCAA
B1-R	TTGCAAATCCCTGGAAGGTT
B2-F	ACTTTAAGAAGGAGATATACATGGCGCAAGACAAA
B2-R	TGGTGGTGGTGGTGCTCGAGCTATATATCTATAGACTGTTGT
M1-F	GGA <u>AGT</u> GGG <u>GCT</u> GGG <u>AGT</u> GGG <u>GCAGCA</u> GGA <u>GCT</u> GGT <u>GCT</u> AGTGTTCATAGTTCATCATTTCGTGAAC
M1-R	TCC <u>TGCTGC</u> CCC <u>ACT</u> CCC <u>AGC</u> CCC <u>ACT</u> TCC <u>TGA</u> CCC <u>ACT</u> CCCAGGGGGGCACTGTGTTATGCCTCG
M2-F	GAGA <u>GGC</u> GATGAT <u>GCT</u> GAA <u>TCTAGT</u> ATACGTGGTGGTGATAGAGAC
M2-R	GTAT <u>ACTAGA</u> TTC <u>AGC</u> ATCATC <u>GCC</u> TCTCCGCGGTTCACGAAATG
M3-F	CTCT <u>GCT</u> AGAAAGGAG <u>GGT</u> GAA <u>TCC</u> TTTGACACGAGAGAAGCC
M3-R	CAAA <u>GGA</u> TTC <u>ACC</u> CTCCTTTCT <u>AGC</u> AGAGTACCGGTCATCTCGC

注: 下划线标注的为组氨酸突变后的氨基酸残基编码的核苷酸序列

1.3 野生型表达载体构建

选取 1.2 中获得的阳性克隆为模板,参照 Ana Paula Jacobus 等的同源重组方法^[30],使用表 1 中引物 B2-F、

B2-R进行 PCR 扩增,将目的片段与线性化的 pET-28a 载 体按一定比例混合并转化大肠杆菌DH5α完成同源重组。 通过对载体插入片段测序鉴定获得大肠杆菌阳性克隆。

1.4 突变型表达载体构建

为探究长牡蛎 VGCC β亚基中参与 Ni-NTA 结合 的关键氨基酸残基,本研究对多个不同位置的组氨 酸残基进行分组突变。突变型 β 亚基分别命名为 M1 (包含的突变位点是 H441S, H443S, H445S, H447A, H449S, H451A, H452A, H454A, H456A), M2(在突变 型 M1 的基础上增加突变位点 H469G, H472A, H474S, H475S), M3(在突变型 M2 的基础上增加突变位点 H533A, H537G, H539S)。表1的引物序列中包含对相 应组氨酸突变后氨基酸残基编码的核苷酸序列,用 下划线标注。突变型表达载体构建方法是,突变型 M1 以 1.3 中的阳性克隆为模板,使用引物 M1-F、 M1-R 进行 PCR 扩增,后续与 1.3 中野生型表达载体 构建相同。突变型 M2 的构建选取 M1 的阳性克隆为 模板,引物使用 M2-F、M2-R;突变型 M3 的构建选 取 M2 的阳性克隆为模板,引物使用 M3-F、M3-R。

1.5 表达菌株的培养及诱导表达

从已完成测序鉴定的阳性克隆中提取构建成功 的表达载体,转入感受态细胞BL21(DE3),37℃培养 过夜并挑取单克隆,接种至卡那抗性的 LB(lysogeny broth)液体培养基中,37℃,220 r/min 培养 8 h 后, 按照1%的比例将表达菌株转接至1 L 的 LB液体培 养基中,加入卡那霉素至终质量浓度 50 μg/mL,随 后在 37℃摇床中 220 r/min 培养至 OD 值为 1.0~1.2, 加入 0.2 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)于 18℃诱导蛋白表达 12 h^[31],6 500 r/min 离心 10 min 收集细菌沉淀。

1.6 VGCC β 亚基纯化

野生型和突变型 β 亚基的纯化步骤完全一致。 首先,在等量野生型和各突变型菌体中加入等体积 裂解缓冲液(25 mmol/L Tris-HCI、pH 8.8,150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L PMSF),冰上均质重悬后,用高压细 胞破碎机进行破碎。随后在4℃,15 000 r/min 离心 1 h 去除未破碎细胞碎片,收集上清液并将其分别 与等量 Ni-NTA (Invitrogen)混合。借助旋转混匀仪 于4℃孵育 120 min 后,用含 10~500 mmol/L 咪唑的 等体积 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8)缓冲液梯度洗脱, 各步留样体积相同,借此定性分析野生型和不同突 变型 β 亚基对 Ni-NTA 的结合能力强弱。利用氨基三 乙酸镍(Ni-NTA)、亚胺基二乙酸铜(Cu-IDA)、亚胺基 二乙酸锌(Zn-IDA)纯化蛋白时,将样品分为等体积 的3份分别与等量的3种亲和柱孵育,纯化步骤与上述相同,各步洗脱及留样体积保持一致。

1.7 SDS-PAGE 凝胶电泳及免疫印迹分析

根据长牡蛎 VGCC β 亚基的分子量,实验选取 浓度为 12.5%的 SDS-PAGE 对各蛋白样品进行分析 鉴定,各样品留样体积、加入的蛋白 loading buffer 及点样量均保持一致。鉴于长牡蛎的 VGCC β 亚基 C 端含有多个组氨酸残基,实验选用针对多组氨酸标 签的一抗 His-tag (27E8) mouse mAb (Cell Signaling Technology)和二抗 anti-mouse IgG, HRP-linked antibody (Cell Signaling Technology)对包括突变型长牡 蛎 VGCC β 亚基在内的不同蛋白样品进行免疫印迹 分析,以进一步确认目的蛋白条带。蛋白量与其印迹 条带的面积和深浅具有相关性^[32],通过 ImageJ 计算 不同样品印迹条带的灰度值,从而实现定量分析。

1.8 长牡蛎闭壳肌中 VGCC 蛋白复合体的 原位提取

分离长牡蛎闭壳肌,研磨后加入裂解缓冲 液(10 mmol/L MOPS-Na、pH 7.4, 0.3 mol/L 蔗糖, 0.5 mmol/L EDTA,复配蛋白酶抑制剂)均质重悬破 碎细胞。随后 4 ℃, 6 450 r/min 离心 5 min,收集上清 液均分为 2 份作为不同去垢剂实验组。超速离心(4 ℃, 41 500 r/min 离心 1 h)收集膜组分,分别加入等体积 含 1%毛地黄皂苷(digitonin)或 1% glyco-diosgenin (GDN)去垢剂的缓冲液(20 mmol/L MOPS-Na、pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L CaCl₂,复配蛋白酶抑 制剂)重悬后,4 ℃过夜孵育增溶^[33],再次超速离心 (73 400 r/min, 30 min)去除不溶组分,收集含有 VGCC 蛋白复合体的上清液用于后续分析。

2 结果与分析

2.1 序列分析

VGCC 是真核细胞中钙离子内流的主要通道, 在神经和肌肉生理活动中发挥重要功能。其最多包 含 5 个亚基: α1 亚基, α2 亚基, β 亚基, δ 亚基和 γ 亚 基。如图 1 所示,将长牡蛎 VGCC β 亚基的氨基酸序 列与多个同源序列进行比对,结果表明,长牡蛎 VGCC β 亚基存在两段在同源蛋白中较为保守的氨 基酸序列,分别为 68~130 位氨基酸组成的 SH3 结构 域和 229~409 位氨基酸组成的 Guanylate kinase 结构 域^[34]。与脊椎动物相比,其他软体动物的 β 亚基氨基 酸序列与长牡蛎的相似性更高,例如,扇贝的序列 相似性为 67.6%,而脊椎动物兔子的序列相似性为 49.8%。长牡蛎β亚基序列C端存在3组聚集的组氨 酸残基,分别用红色、橙色、黄色标注。红色标注的 (HG)₇序列在真核生物 CDF 蛋白家族也有报道,其 loop 4含有富含组氨酸的序列(HX)_n,其中 X 通常是 G 或 C, n=3~6。这些序列可能参与了生理活动中与 金属离子的结合^[35]。除此之外,对比图 1 中列出的脊 椎动物 β 亚基氨基酸序列发现,软体动物 β 亚基的 C 端普遍存在多组聚集的组氨酸序列(紫色标注),尤 其是海蜗牛 β 亚基 C 端的 H₃、H₆序列。天冬氨酸残 基也常与聚集的组氨酸残基同时出现。软体动物 VGCC β 亚基 C 端富含的组氨酸序列与功能之间的 关系还有待进一步探索与研究。

		10)	20	30	40	50	60	70
Crassostrea gigas Pecten maximus Aplysia californica Octopus sinensis Mytilus galloprovincialis Mus musculus Homo sapiens Xenopus laevis Oryctolagus cuniculus	$1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\$	MVQQNRMART	PSSSMQE	IQMDVLEGI	- MAQI - MADI - MALA - MARH - MKATV ISLQAKYAKF	DKHRPKKNTF PSQFSELTD PTQFCEFVE SSHYKELDG VIRLLKRAKG VIRLLKRAKG KSRFKRSDG	TKTER	KK GK I KRS KRKGK F NKRS KRKG GK F KRS	100% DGSF 67.6% DGSF 65.2% DGSF 60.7%
Crassostrea gigas Pecten maximus Aplysia californica Octopus sinensis Mytilus galloprovincialis Mus musculus Homo sapiens Xenopus laevis Oryctolagus cuniculus	18 36 40 39 5 22 16 53 1	80 	WE S AD S I G S G D S N I G S A D S N Y G S A E S T C S Q D Q Y N L G S A D S Y T G S A D S Y T G S A E S Y T G S A E S Y T	90 S Q T T - P D A S Q P S - S D T S Q P S - S D T S Q P S - T D L L D S S - S S S R P S D S D V S R P S D S D V S R P S D S D V S R P S D S D V		$\begin{array}{c c} \mathbf{H} \mathbf{H} \mathbf{H} \mathbf{H} \mathbf{H} \mathbf{H} \mathbf{H} H$	120 1 HKAKSKPVA Q L HKAKSKPVA Q L EKAKTKPVA Q L E KAKTKPVA Q L E KAKTKPVA	130 A V R T N V A I N G A V R T N V A Y E G A V R T N V S Y D G A V R T N V S Y D A A V R T N V S Y D A A V R T N V S Y S A A V R T N V G Y S P A V R T N V G Y S P	140 A D G 100% Q M 67.6% V D 65.2% L D 60.7% Q D 55.7% A B D 55.2% P G D 51.5% P G D 49.8%
Crassostrea gigas Pecten maximus Aplysia californica Octopus sinensis Mytilus galloprovincialis Mus musculus Homo sapiens Xenopus laevis Oryciolagus cuniculus	83 104 108 107 22 83 77 118 43	IS GDC P A P G H C Y - E C P A H G H A Y - D S P V H G Y A Y - D S P V H G Y A Y - D S P V P G MA I - D V P V P G MA I - D V P V P G MA I - D A P V Q G M C I - E V P V E G V A I	S F D V K D F S F G V K D F S F G V R D Y S F T C K D F S F E A K D F S F E A K D F N F D P K D F T F E P K D F	160 I I K E K F N N L H I K E K F N N L H I K E K F N N I H I L E K F N N Q K F N N L H K E K F N N L H I K E K F N N L H I K E K F N N L H I K E K F N N	170 	180 D G C D D C F I P C E G C D V G F I P C E G C D V G F I P C E G C P V G F I P C E G C P V G F I P C E G C E I G F I P C E G C E V G F I P C E G C E V G F I P	190 S P AK LE N L N S L S S P AK LE N L N S L S S P AK LE N L K Y Q S P AK LE N L K Y Q S P AK LE N K Y Q S P V K LE N M K Q S P V K LE M M L Q S P V K LE H M R L Q S P V K LE H M R L Q	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	210 K M Y V 100% K V Y S 67.6% K L Y I 65.2% K F Y G 60.7% K F Y S 55.7% K F Y S 55.7% K F Y S 55.2% R L S S 51.5% R L S S 49.8%
Crassostrea gigas Pecten maximus Aplysia californica Octopus sinensis Mytilus galloprovincialis Mus musculus Homo sapiens Xenopus laevis Oryctolagus cuniculus	147 172 175 173 72 150 144 185 110	22 R R N D S N T T ME N K T P S S S N I E S K T N S S S N I D A K N P S S N I D A K N P S S N I E S K S G G N S S S S K S G G N S S S S K S G G N S S S S K S G G N S S S	GML GQG - SLLGTGG NLLNSS - NFSRVS - SLLGTGG NLLNSS - - LGDIV LGDIV LGDVV	230 TGMNSS TGNPSS TGNPSS TPPTPGFQN - GNPS SGI TGI	240 	250 P	200 D E N G A D S	270 - TVG E DS DS - TMG E DS DS - TMG E DS DS - NVG E DS DS - NVG E DS SS - QS TV D DS - A E E N I F A - E Q D	280 TKAY 100% VG S 67.6% LG S 65.2% LS V 60.7% VG S 56.5% HR P 55.7% 55.2% 51.5% S G S A 49.8%
Crassostrea gigas Pecten maximus Aplysia californica Octopus sinensis Mytilus galloprovincialis Mus musculus Homo sapiens Xenopus laevis Oryctolagus cuniculus	199 226 227 231 132 199 178 214 166	29 K S G G T I P P KM G K S S V T P P K S S K A S I T P P K Q S - S S V T P K Q S - S S V T P K P S A N S V T S P K T S V S S V T P	A - KEKKK S - KEKKK A - KEKKK A - KEKRK S G KEKKK S G KEKKK H S K E K KK Q W K T A G L	300 P F F K K S E S P F F K K S E S P F F K K S E S P F F K K S E N P F F K K S E N P F F K K T E H K S T E H P F F K K T E H	310 P P Y E V V P S N P P Y D V V P S N P P Y D V V P S N P P Y D V V P S N	300 IRPVVLIGPS IRPVVLIGPS IRPVVLIGPS IRPVVLVGPS IRPVVLVGPS IRPVLVGPS IRPITLVGPS	330 L K G Y E V T D MM Q F L K G Y E V T D MM Q F L K G Y E V T D MM Q F L K G Y E V T D MM Q F L K G Y E V T D MM Q F L K G Y E V T D MM Q F L K G Y E V T D MM Q F	340 CALFDFLKHRF CALFDFLKHRF CALFDFLKRRF CALFDFLKHRF CALFDFLKHRF CALFDFLKHRF CALFDFLKHRF CALFDFLKH <mark>L</mark> F	350 EGRI 100% EGRI 67.6% EGRI 65.2% EGRI 65.2% EGRI 55.7% EGRI 55.2% DGRI 51.5% DGRI 49.8%
Crassostrea gigas Pecten maximus Aplysia californica Octopus sinensis Mytilus galloprovincialis Mus muscuhis Homo sapiens Xenopus laevis Oryctolagus cuniculus	266 295 296 300 201 269 239 265 236	36 1 I TRV AD I S 1 I TQV AD I S 1 I TQV AD I S 1 I TRV AD I S 1 I TRV V AD I S S I TRV TAD I S	LAKRSII LAKRSIL LAKRSIL LAKRSIL LAKRSIL LAKRSVI LAKRSVI LAKRSVI LAKRSVI	370 NN P S K R V I I NK P G N R M S NN P S K R A NN P K K A NN P S K H A NN P S K H A NN P S K H I	380 D KQ S R - S C C S P K T P P C I E R T N P R A S I E R S N S KM S I E R S N T - R S	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	410 Q L V V L D C D T I Q L V V L D C D T I Q L V V L D C D T I Q L V V L D C D T I Q L V V L D C D T I Q L V L D C D T I Q L V V L D A D T I Q L V A L D A D T I Q L V A L D A D T I	420 NHPS 100% NHPS 67.6% NHPS 65.2% NHPS 60.7% NHPS 56.5% NHPA 55.2% NHPA 51.5% NHPA 49.8%
Crassostrea gigas Pecten maximus Aplysia californica Octopus sinensis Mytilus galloprovincialis Mus musculus Homo sapiens Xenopus laevis Oryctolagus cuniculus	332 358 363 367 266 335 305 331 302	43 QLAKTSLAPI QLAKTSLAPI QLAKTSLAPI QLAKTSLAPI QLSKTSLAPI QLSKTSLAPI QLSKTSLAPI QLSKTSLAPI QLSKTSLAPI	IVYVKIA IVYVKIA IVYVKIS IVYIKIS IVYIKIS	440 S P K V L Q R L S P K V L Q R L	450 K S R G K S Q S K K S R G K S Q A K K S R G K S Q S K K S R G K S R K S K S K S K S K S K S K S K S K	460 I. M.N.V.Q.L.V.A.A. I. M.N.V.Q.L.V.A.A. I. M.N.V.Q.L.V.A.A. I. M.N.V.Q.L.V.A.A. I. M.N.V.Q.L.V.A.A. I. L.N.V.Q.M.V.A.A. I. L.N.V.Q.M.V.A.A. I. L.N.V.Q.M.V.A.A.	470 1	489 V I L D E N Q L E D V I L D E N Q L E D V I L D E N Q L E D V I L D E N Q L E D V I L D E N Q L E D V I L D E N Q L E D V I L D E N Q L E D V I L D E N Q L E D V I L D E N Q L E D V I L D E N Q L E D V I L D E N Q L E D	490 I ACEH 100% ACEH 67.6% ACEH 65.2% ACEH 65.2% ACEH 55.7% ACEH 55.7% ACEH 51.5% ACEH 51.5%

		500	510	520	530	540	550	560
Crassostrea gigas Pecten maximus Aplysia californica Octopus sinensis Mytilus galloprovincialis Mus musculus Homo sapiens Xenopus laevis Oryciolagus cuniculus	402 428 433 437 336 405 375 401 372	LAEFLEAYWKATH LAEFLEAYWKATH LAEFLEAYWRATH LAEYLERYWRATH LAEYLEVYYRAA LADYLEAYWKATH LADYLEAYWKATH LAEYLEAYWKATH	P V D N T P Q - S P R P P N N T P Q - S P R P A S M N P Q - N P P D L T P H T T R P P S G N L P - N P L P S S L P - N P L P A S I N P P - N P L P P S S T P - N P L	- TKLMPS QHGQGPPS AQHRPGGSG KHHSSHT HHGHSPHSP LSRTLASS LSRTLATS LSRTLATS	N P R HN T V P N P S R HN T V P MA R HN T V P VI S S L S RE VI S P T LA S N L P S P T LA S N L P S P A P V S N L L A S P A P V S N L	C HGHGHGHGH - HMS S N GHMS HS Q L HGD S P HG S Q H Q G S Q G D Q R P D Q G S Q G D Q R T D Q	GH RSAP-RSASQA RSAPIRSASQA	1009 67.6% 67.6% 60.7% 56.5% 56.5% EEEPC 55.7% EEEPS 55.2% 51.5% 49.8%
		570	580	590	600	610	620	630
		570		590	000	010	020	0.50
Crassostrea gigas Pecten maximus Aplysia californica Ociopus sinensis Mytilus galloprovincialis Mus musculus Homo sapiens Xenopus laevis Oryctolagus cuniculus	451 475 481 483 385 473 444 415	HGHGH S VH S S F - R PH SMD R D S PD - R S G S L E R VH S PD - P E RQ LHE RG S G - PD - P E RQ LHE RG S S - PD - P LE P VK KS O HR S S - PD - V V V L T S V V V L T S	REPR	EHHIR RHHQ RHQ GRGLSRQET SRGLSRQET LKQNLG LRRNLS	G G D R D - T S P S R S H D H D - V S P S H A R E H H H S H H H D R E Y D - S E R T H S H E H D - A G R T Y F D S E T Q E S R D S F D S E T Q E S R D S F W G G R G E P F W G G L E T S Q R G	E K L H H D H D H G H H H H H H H 'D K K H H D H D H G H H H H H H 'D K M H E R 'A Y V E P K - G G A V P Q Q		RSDY 1009 ADRR 67.69 GGRHH 65.29 60.79 YDRR 56.59 HNHR 55.79 HNHR 55.29 HNHR 55.29 HNHR 55.29 HAM- 49.89
		640	650	660	670	680	690	
Crassostrea gigas Pecten maximus Aplysia californica Octopus sinensis Mytilus galloprovincialis Mus musculus Homo sapiens Xenopus laevis Oryctolagus cuniculus	506 544 529 524 431 542 514 475 450	NRMS PRDYDRRDH RDYVGHGDRE PRG DDDDDYDSDRQRG - VPEFTDIR- EETHSSNGHRHRE DETHGSSDHRHRE	S G E MH E P R R D D H S Y D H R R G D H G G G G E H R S G D S D - G V H D R R D R S H E Y K H D S R H R S R D M G R D S R H R S R D V D R E	R Y S HRKE HE S R P Y G R E R D HH Y S HHHH HH V D S R E R G D R L Y S D E Q D Q D HN E C I K Q Q D HN E C N K Q	HFDTR - EAYGS TIDS KYGS HPHH HAS SIDP RYGS RSRHKSKDRYC RSRHKSKDRYC	PT RN S PT RN S S P RN S S S PR S QR PR S QR PS RN S K R CE KD GE V I S K R	X P PMK Q S I D Q Q MK Q S I D I X P PK R G I D I Y P K HGS I D I D I Y P K HGS I D I D I I Y P K K G S I D I <	1009 67.69 65.29 60.79 56.59 71RQ 55.79 71RQ 55.29 71RQ 55.29 71RQ 55.88 49.89

图 1 长牡蛎电压门控钙离子通道β亚基及其同源蛋白序列比对结果

Fig.1 Sequence alignment of voltage-gated calcium channel β subunit (*Crassostrea gigas*) with its homologous proteins 注: 蓝色部分为一致性 100%的残基, 浅蓝色部分为相似残基(Threshhold % for shading 设为 60%)。3 组组氨酸残基分别用红、橙、黄色 标记, 突变体 M1 对应红色区域中组氨酸残基突变, 突变体 M2 对应红色及橙色区域中组氨酸残基突变, 突变体 M3 对应红、橙、黄色 区域中组氨酸残基全突变, 其他物种序列中聚集的组氨酸残基用紫色标记。氨基酸序列的 Accession number 如下: 长牡蛎(*Crassostrea gigas*) XP_011429591.2, 扇贝(*Pecten maximus*) XP_033728564.1, 海蜗牛(*Aplysia californica*) XP_035825861.1, 章鱼(*Octopus sinensis*) XP_029654560.1, 紫 贻 贝 (*Mytilus galloprovincialis*) VDI38901.1, 小 鼠 (*Mus musculus*) XP_006497382.1, 人 (*Homo sapiens*) XP_011517961.1, 非洲爪蟾(*Xenopus laevis*) XP_041435102.1, 穴兔(*Oryctolagus cuniculus*) NP_001075748.1

2.2 不同金属离子亲和柱选择分析

通过分子克隆得到的长牡蛎 VGCC β亚基序列, 经 DNA 测序分析,与 NCBI 数据库中长牡蛎 VGCC β亚基 X3 亚型(Accession number: XP_011429591.2) 完全一致。在未添加任何亲和标签的情况下,重组表 达后获得的蛋白分子量为 63.7 kDa,且该蛋白表达 量较高。基于该重组蛋白的氨基酸序列,借助 C-I-TASSER On-line Server(https://zhanggroup.org// C-I-TASSER/)对长牡蛎 VGCC β亚基的结构进行预 测,结果表明 β亚基 C 端 3 组较为连续的组氨酸残 基均位于柔性较大的区域,有利于固定相金属亲和 层析方法的运用。

在柱料体积满足目的蛋白载量要求的前提下, 未添加亲和标签的 β 亚基与 Ni-NTA、Cu-IDA 及 Zn-IDA 金属离子亲和柱的亲和实验结果显示(图 2), Ni-NTA 亲和实验中,在 200~500 mmol/L 咪唑浓度 下目的蛋白洗脱量最大,低咪唑浓度对目的蛋白洗 脱能力微弱; Cu- IDA 与 Zn-IDA 的表现类似,在咪唑 物质的量浓度为 10 mmol/L 时,二者均开始出现少 量 β 亚基洗脱,且随着咪唑浓度的逐渐增加, β 亚基 洗脱量逐步加大。质谱结果显示(数据未展示),图 2 中分子量 50~70 kDa 间的条带均为目的蛋白 VGCC β 亚基,其呈现的分子量大小差异原因未知。综上, 长牡蛎 VGCC β 亚基 C 端天然存在的 3 组较为连续 的组氨酸残基可与 Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺等几种不同的金 属离子亲和柱结合,通过分析咪唑梯度洗脱得到的 目的蛋白的相对比例和洗脱趋势,后续实验均选用 更易获得的 Ni-NTA 进行分析。

2.3 长牡蛎 VGCC β 亚基的纯化

为明确长牡蛎 VGCC β 亚基中参与 Ni-NTA 结合的关键氨基酸残基,本研究对其 C 端 3 组较 为连续的组氨酸残基(图 1)进行了分组突变,并在 相同的亲和层析纯化条件下,选用不同浓度的咪唑 (10~300 mmol/L)进行梯度洗脱。图 3a 显示,野生 型 β 亚基与 Ni-NTA 的结合能力最强,咪唑浓度为 300 mmol/L 时 β 亚基有峰值洗脱,该洗脱浓度与 多组氨酸标签亲和层析方法纯化蛋白通常使用的 洗脱浓度相等,显示其同 Ni-NTA 的结合能力与多 组氨酸标签相当。相比之下,突变型 β 亚基与 Ni-NTA 的结合能力显著下降,且随着组氨酸残基

研究报告 REPORTS



图 2 长牡蛎电压门控钙离子通道 β 亚基的不同金属离子亲和层析纯化

Fig. 2 Purification of voltage-gated calcium channel β subunit (*Crassostrea gigas*) with different metal ion affinity chromatography 注: 不同金属离子亲和层析纯化过程中,不同浓度咪唑梯度洗脱样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果,使用考马斯亮蓝染色; Marker 为蛋白 分子量标准, Flow through 为亲和层析流穿样品



(a) Ni-NTA亲和层析纯化过程中不同浓度咪唑洗脱样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果



(b) Ni-NTA亲和层析纯化过程中部分浓度咪唑洗脱样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳和对应的蛋白质免疫印迹结果

图 3 野生型及突变型长牡蛎电压门控钙离子通道β亚基的纯化

Fig. 3 Purification of wild-type and mutant voltage-gated calcium channel β subunit (*Crassostrea gigas*) 注: (a)为 Ni-NTA 亲和层析纯化过程中不同浓度咪唑洗脱样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果,使用考马斯亮蓝染色; (b)为 Ni-NTA 亲和 层析纯化过程中部分浓度咪唑洗脱样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳(左)和对应的蛋白质免疫印迹(右)结果,聚丙烯酰胺凝胶电泳使用考 马斯亮蓝染色,蛋白质免疫印迹所用一抗为组氨酸标签特异性鼠源单抗,二抗为 HRP 偶联的鼠 IgG 特异性抗体; Marker 为蛋白分子 量标准 突变数量的增多, 各突变体与 Ni-NTA 的结合能力 逐渐变弱, 较低浓度咪唑即可洗脱大部分 β 亚基突 变体。为了更好的对洗脱的 β 亚基进行量化和对比, 借助 ImageJ 对图 3a 中的目的蛋白条带进行灰度值 计算(表 2)。 突变体 M1 在咪唑浓度为 80 mmol/L 时 出现峰值洗脱; 突变体 M2 在 60 mmol/L 咪唑时出 现峰值洗脱; 突变体 M3 的洗脱峰值对应的咪唑浓 度为 20 mmol/L。

表 2 咪唑梯度洗脱样品 SDS-PAGE 目的蛋白条带灰度值分析 Tab. 2 Gray value analysis of target protein bands in imidazole gradient elution

样品 —	目的蛋白条带灰度值								
	10 mmol/L 咪唑	20 mmol/L 咪唑	60 mmol/L 咪唑	80 mmol/L 咪唑	300 mmol/L 咪唑				
β	—	4.10	5.03	6.71	8.88				
M1		5.72	13.80	15.91	0.70				
M2	6.28	6.39	9.87	_	1.38				
M3	8.52	10.73	8.89	_	0.70				

注: 上述为图 3a 中目的蛋白条带灰度值的计算结果, 背景值为空白, 以"样品扣除空白后的灰度值与空白灰度值的比值"表示; "—" 表示无该样品

选取图 3a 中的部分样品进行蛋白质免疫印迹实 验(图 3b)。M1 虽然仍可与 Ni-NTA 有较好的结合,但 是其印迹信号较野生型 β 亚基明显减弱,说明(HG)₇ 序列中的组氨酸残基是多组氨酸标签抗体识别的关 键位点。对剩余 2 组组氨酸残基进一步突变得到的 M2、M3 突变体难以检测到可靠免疫印迹信号(数据 未展示)。

2.4 长牡蛎 VGCC 蛋白复合体的原位提取 及免疫印迹检测

长牡蛎是一种海洋软体动物,并非模式动物, 其研究过程中,常遇到缺少特异性抗体的情况。前述 蛋白质免疫印迹结果显示,重组表达的长牡蛎 VGCC β亚基C端天然(HG)7序列能与多组氨酸标签 抗体特异性结合,因此,在提取长牡蛎 VGCC 蛋白 复合体时、选用针对多组氨酸标签的一抗及相应二 抗对 VGCC 蛋白复合体中β亚基进行免疫印迹分析, 可以监测蛋白复合体提取情况。结果显示,在从长牡 蛎闭壳肌中原位提取 VGCC 蛋白复合体的过程中, 天然存在的 β 亚基仍然具有明确的免疫印迹信号。 在提取过程中, 经超速离心和去垢剂增溶后, 水溶 性的 β 亚基主要位于膜组分中, 部分证明了 VGCC 蛋白复合体的完整性。作为 VGCC 蛋白复合体的一 部分, β 亚基的含量是 VGCC 蛋白复合体含量的合 理指征,分析 β 亚基的含量,可以辅助优化 VGCC 蛋白复合体的提取条件。据图 4 中 β 亚基含量分布, digitonin 是更适合 VGCC 复合体增溶的去垢剂。



图 4 长牡蛎电压门控钙离子通道蛋白复合体的原位提取 Fig.4 Extraction of voltage-gated calcium channel complex of *Crassostrea gigas*

注: 泳道 1 为细胞裂解后 6 450 r/min 离心的上清; 泳道 2 为细胞 裂解后 6 450 r/min 离心的沉淀; 泳道 3 为 41 500 r/min 超速离心 后的上清; 泳道 4 为去垢剂 digitonin 增溶后 73 400 r/min 超速离 心的上清; 泳道 5 为去垢剂 digitonin 增溶后 73 400 r/min 超速离 心的沉淀; 泳道 6 为去垢剂 GDN 增溶后 73 400 r/min 超速离心的 上清; 泳道 7 为去垢剂 GDN 增溶后 73 400 r/min 超速离心的沉淀

3 讨论

蛋白质纯化是生命科学研究中重要的一环,方 法多样,应用灵活。在实际研究中,为满足蛋白质的 纯度要求以及更好地适应下游需求,研究者往往会 选用多种纯化方法综合应用,如先借助亲和层析去 除绝大部分的杂蛋白,然后根据蛋白质分子量的不 同通过分子排阻层析对样品进一步分离,使目的蛋 白的纯度逐步提升。选用亲和层析进行蛋白纯化时, 目的蛋白与亲和柱结合的特异性以及亲和力均为重 要的考虑因素。一般来说特异性越高、亲和力越强, 越有利于通过淋洗去除更多的杂质,获得足量高纯 度的蛋白。在目的蛋白的 C/N 端融合外源亲和标签 是实现上述目标的有效方法。

当目的蛋白具有与亲和标签相似的氨基酸序列

特征时,能否利用该序列特征实现高效的无标签亲和层析纯化是本研究的重点。结果表明,长牡蛎 VGCC β 亚基 C 端天然存在的富含组氨酸残基的序 列能够满足 Ni-NTA 亲和层析的要求。而在该蛋白 C 端和 N 端分别添加多组氨酸标签后,相同亲和层析 条件下,无论是纯度还是得率均无显著优势(数据未 展示)。

Wu 等人^[36]在对兔子 VGCC 蛋白复合体进行 纯化时,为减少样品损失省去了分子排阻层析的 步骤,由此可见,在样品量受限的情况下,通过减 少纯化步骤提高最终产量是必要的。无标签亲和层 析法利用目的蛋白自身氨基酸序列特点,避免了 融合标签使用后对目的蛋白结构和功能的影响, 省去了酶切去除外源标签的步骤,减少了对目的 蛋白产量的影响。

蛋白复合体亚基数量多,表达纯化复杂,常用 原位提取的方法,无法依赖外源标签,且非模式生 物来源的蛋白质缺乏特异性抗体,难以通过常用的 免疫印迹方法对提取过程进行监测。本研究的实验 结果显示,原位提取的VGCC蛋白复合体中存在的β 亚基具有明确的免疫印迹信号,成为筛选增溶去垢 剂等提取条件优化的重要参考,可以在非模式生物 蛋白复合体研究中发挥重要作用。

无标签亲和层析纯化的方法也存在一定的局限 性。本研究结果显示,长牡蛎 VGCC β 亚基 M2、M3 突变体蛋白仍可与 Ni-NTA 结合,但难以获得可靠免 疫印迹信号。因此,能与 Ni-NTA 亲和柱结合的蛋白 未必可以借助多组氨酸标签的抗体进行免疫印迹检 测,可能由于免疫印迹方法对组氨酸残基的连续性 要求更高。

4 结论

本研究选取 C 端天然富含组氨酸残基的长牡蛎 电压门控钙离子通道 β 亚基,开展了无标签亲和层 析纯化。结果表明,长牡蛎 VGCC β 亚基可与 Ni²⁺、 Cu²⁺、Zn²⁺等多种金属离子亲和柱有效结合,其中与 Ni-NTA 的结合能力最强,组氨酸残基的数量与结合 能力正相关。另外,本研究发现针对多组氨酸标签的 抗体可用于(HG)₇序列的蛋白质免疫印迹分析,并将 其进一步应用于 VGCC 蛋白复合体的提取过程中。 本研究为具有相似序列特征的蛋白质纯化提供了重 要参考,也为缺少特异性抗体的蛋白复合体的原位 提取过程监测提供了思路。

参考文献:

- NEVONE A, MERLINI G, NUVOLONE M. Treating protein misfolding diseases: therapeutic successes against systemic amyloidoses[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 1024.
- [2] CHAUDHURI T K, PAUL S. Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches[J]. FEBS Journal, 2006, 273(7): 1331-1349.
- [3] GRÄSLUND S, NORDLUND P, WEIGELT J, et al. Protein production and purification[J]. Nature Methods, 2008, 5(2): 135-146.
- [4] THEKKILAVEEDU S, KRISHNASWAMI V, MOHANAN D P, et al. Lactic acid-mediated isolation of alpha-, betaand kappa-casein fractions by isoelectric precipitation coupled with cold extraction from defatted cow milk[J]. International Journal of Dairy Technology, 2019, 73(1): 31-39.
- [5] RAJESH S, CRANDALL C, SCHNEIDERMAN S, et al. Cellulose-graft-polyethyleneamidoamine anion-exchange nanofiber membranes for simultaneous protein adsorption and virus filtration[J]. ACS Applied Nano Materials, 2018, 1(7): 3321-3330.
- [6] CAI W X, TUCHOLSKI T, CHEN B F, et al. Top-down proteomics of large proteins up to 223 kDa enabled by serial size exclusion chromatography strategy[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(10): 5467-5475.
- [7] LIU S X, LI Z H, YU B, et al. Recent advances on protein separation and purification methods[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2020, 284: 102254.
- [8] LI B L, GUO F, HU H, et al. The characterization of column heating effect in nanoflow liquid chromatography mass spectrometry (nanoLC-MS)-based proteomics[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2020, 55(1): e4441.
- [9] XING J, WANG M H, WANG S, et al. Analysis of proteins by capillary electrophoresis with a novel diazoresin/β-Cyclodextrin covalent capillary coating method[J]. Ferroelectrics, 2020, 563(1): 45-51.
- [10] AYYAR B V, ARORA S, MURPHY C, et al. Affinity chromatography as a tool for antibody purification[J]. Methods, 2012, 56(2): 116-129.
- [11] ZHAO X Y, LI G S, LIANG S F. Several affinity tags commonly used in chromatographic purification[J]. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2013, 2013: 581093.
- [12] LICHTY J J, MALECKI J L, AGNEW H D, et al. Comparison of affinity tags for protein purification[J]. Protein Expression and Purification, 2005, 41(1): 98-105.
- [13] WAUGH D S. Making the most of affinity tags[J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(6): 316-320.
- [14] NOROUZI R, HOJATI Z, BADR Z. Overview of the

recombinant proteins purification by affinity tags and tags exploit systems[J]. Journal of Fundamental and Applied Sciences, 2016, 8(3S): 90-104.

- [15] HARPER S, SPEICHER D W. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase[J]. Methods in Molecular Biology, 2011, 681: 259-280.
- [16] WAUGH D S. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags[J]. Protein Expression and Purification, 2011, 80(2): 283-293.
- [17] UHLÉN M, FORSBERG G, MOKS T, et al. Fusion proteins in biotechnology[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1992, 3(4): 363-369.
- [18] RIGUERO V, CLIFFORD R, DAWLEY M, et al. Immobilized metal affinity chromatography optimization for poly-histidine tagged proteins[J]. Journal of Chromatography A, 2020, 1629: 461505.
- [19] KIMPLE M E, BRILL A L, PASKER R L. Overview of affinity tags for protein purification[J]. Current Protocols in Protein Science, 2013, 73: 9.9.1-9.9.26.
- [20] BOOTH W T, SCHLACHTER C R, POTE S, et al. Impact of an N-terminal polyhistidine tag on protein thermal stability[J]. ACS Omega, 2018, 3(1): 760-768.
- [21] MAJOREK K A, KUHN M L, CHRUSZCZ M, et al. Double trouble-buffer selection and his-tag presence may be responsible for nonreproducibility of biomedical experiments[J]. Protein Science, 2014, 23(10): 1359-1368.
- [22] 马晓川,费浩.金属配位在多肽与蛋白质研究中的应用[J].化学进展,2016,28(2/3):184-192.
 MA Xiaochuan, FEI Hao. The use of metal coordination in peptide and protein research[J]. Progress in Chemistry, 2016, 28(2/3):184-192.
- [23] WEISKIRCHEN R, MOSER M, WEISKIRCHEN S, et al. LIM-domain protein cysteine- and glycine-rich protein 2 (CRP2) is a novel marker of hepatic stellate cells and binding partner of the protein inhibitor of activated STAT1[J]. Biochemical Journal, 2001, 359: 485-496.
- [24] REN D, PENNER N A, SLENTZ B E, et al. Histidine- rich peptide selection and quantification in targeted proteomics[J]. Journal of Proteome Research, 2004, 3(1): 37-45.
- [25] CUN S J, LI H Y, GE R G, et al. A histidine-rich and cys-

teine-rich metal-binding domain at the C terminus of heat shock protein A from *Helicobacter pylori*: implication for nickel homeostasis and bismuth susceptibility[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(22): 15142-15151.

- [26] SINGH B, MCCAFFERY J N, KONG A, et al. Purification of native histidine-rich protein 2 (nHRP2) from Plasmodium falciparum culture supernatant, infected RBCs, and parasite lysate[J]. Malaria Journal, 2021, 20(1): 405.
- [27] PATEL K K, POON I K, TALBO G H, et al. New method for purifying histidine-rich glycoprotein from human plasma redefines its functional properties[J]. IUBMB Life, 2013, 65(6): 550-563.
- [28] HALL T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. Nucle Acids Symposium Series, 1999, 41: 95-98.
- [29] MADEIRA F, PARK Y M, LEE J, et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(W1): W636-W641.
- [30] JACOBUS A P, GROSS J. Optimal cloning of PCR fragments by homologous recombination in *Escherichia coli*[J]. PloS One, 2015, 10(3): e0119221.
- [31] WU J P, YAN Z, LI Z Q, et al. Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex[J]. Science, 2015, 350(6267): aad2395.
- [32] MAHMOOD T, YANG P C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting[J]. North American Journal of Medical Sciences, 2012, 4(9): 429-434.
- [33] ZHAO Y Y, HUANG G X, WU J P, et al. Molecular basis for ligand modulation of a mammalian voltagegated Ca²⁺ channel[J]. Cell, 2019, 177(6): 1495-1506.
- [34] CHEN Y H, LI M H, ZHANG Y, et al. Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca²⁺ channels[J]. Nature, 2004, 429(6992): 675-680.
- [35] PAULSEN I T, SAIER M H. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins[J]. Journal of Membrane Biology, 1997, 156(2): 99-103.
- [36] WU J P, YAN Z, LI Z Q, et al. Structure of the voltage-gated calcium channel Ca(v)1.1 at 3.6 A resolution[J]. Nature, 2016, 537(7619): 191-196.

Purification of voltage-gated calcium channel β subunit from Pacific oyster with tag-free affinity chromatography

LIU Feng-hua^{1, 2, 3}, WANG Hao^{1, 2}, JIA Qiao-ya^{1, 2}, BI Yun-chen^{1, 2, 3}

(1. CAS and Shandong Province Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Center for Ocean Mega-Science, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Marine Biology and Biotechnology Laboratory, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China)

Received: Dec. 31, 2021

Key words: voltage-gated calcium channel; β subunit; protein purification; affinity chromatography; polyhistidine

Abstract: Affinity chromatography is widely used in protein extraction and purification. Common affinity tags include the glutathione sulfhydryl transferase (GST) tag, the maltose-binding protein (MBP) tag, and the polyhistidine tag. However, the attachment of an exogenous affinity tag could affect the structure and function of the target protein, thus usually further removed via enzyme digestion, causing longer procedures and lower yields. Certain amino acid sequences, naturally found in some proteins, feature similarity to specific affinity tags. Tag-free purification based on this sequence feature may effectively avoid the mentioned problems. In this study, the voltage-gated calcium channel (VGCC) β subunit, which is naturally histidine-rich in the C-terminal, was purified with tag-free affinity chromatography. The results showed that Ni-NTA could specifically bind to the β subunit, and the binding ability is equivalent to that of the polyhistidine tag. Mutant β subunits showed gradual decreasing binding ability with Ni-NTA correlating to the number of mutated histidine residues. Western blot analysis with anti-His tag showed specific blotting of β subunit and the C-terminal (HG)₇ sequence was key to the antibody recognition. This natural amino acid feature of the VGCC β subunit was also successfully employed as indication of the VGCC complex integrity in the key steps of protein extraction. In summary, tag-free affinity chromatography purification strategy is performed in this study by relying on the natural amino acid sequence similarity to affinity tags found in some proteins, providing a reference for extraction and purification of proteins with similar characteristics.

(本文编辑:杨 悦)