

红色红曲菌组蛋白去乙酰化酶 MrSir2 的原核表达及活性分析

郭美月, 张静, 颜青青, 邵彦春

(华中农业大学食品科技学院, 湖北武汉 430070)

摘要: 根据基因组序列信息, 利用 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid-amplification of cDNA ends, RACE) 得到了红色红曲菌中组蛋白去乙酰化酶 *mrsir2* 基因的完整 cDNA 序列, 其编码序列 (coding sequence, CDS) 为 1539 bp, 编码 512 个氨基酸, 含有一个 SIR2 蛋白保守结构域。根据大肠杆菌的密码子的偏好性对 *mrsir2* 序列进行优化, 优化后的序列与 pET-28b 载体连接后转入宿主菌 *E. coli* BL21 中进行 IPTG 诱导表达, 并优化表达条件。实验结果表明: 在 16 °C 条件下用终浓度为 0.25 mM 的 IPTG 诱导培养 16 h 后, 目的蛋白 MrSir2 可溶性表达效果良好。Ni²⁺柱亲和层析纯化后的 MrSir2 重组蛋白在 SDS-PAGE 上显示为一条约 75 ku 大小的条带, 蛋白定量浓度达 1.97 mg/mL, 经 Western blot 鉴定为目的蛋白, 测定酶活为 78.5(OD/min/mg), 780 μM 的二氢香豆素 (dihydrocoumarin, DHC) 对 MrSir2 蛋白的酶活抑制率为 47%。MrSir2 蛋白的可溶性表达为全面了解其酶学特征提供了材料, 也为体外分析蛋白相互作用奠定了基础。

关键词: 红色红曲菌, 组蛋白去乙酰化酶 MrSir2; 原核表达; 酶活分析

文章编号: 1673-9078(2020)05-163-169

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.5.022

Prokaryotic Expression and Enzyme Activity Analysis of Histone

Deacetylase MrSir2 from *Monascus ruber*

GUO Mei-yue, ZHANG Jing, YAN Qing-qing, SHAO Yan-chun

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: According to the sequenced genomic DNA information, the whole cDNA sequence of *mrsir2* gene was obtained by rapid-amplification of cDNA ends (RACE) corresponding to coding sequence (CDS) with 1539 bp, which codes for 512 amino acids and contains a conserved domain of SIR2 protein. The CDS of *mrsir2* was optimized according to the codon preference of *E. coli*. The CDS of *mrsir2* was ligated to the pET-28b vector and then transferred into the host strain *E. coli* BL21 to be induced expression by IPTG. The expression condition was optimized. The experiment results showed that the target protein MrSir2 was expressed well in soluble way when the host was induced by IPTG at a final concentration of 0.25 mM for 16 h at 16 °C. The soluble recombinant protein was purified with Ni²⁺ column affinity chromatography. Result of SDS-PAGE showed a band with the molecular weight of approximate 75 ku. The protein concentration was as high as 1.97 mg/mL. The target protein was identified by western blot. The enzyme activity was 78.5 (OD/min/mg) detected by Epigenase™ Universal SIRT Activity/Inhibition Assay Kit (Colormetric). The inhibition rate of 780 μM dihydrocoumarin(DHC) to MrSir2 was 47%. The soluble expression of MrSir2 provided materials for understanding its enzymatic characteristics. Results will provide the foundation for exploring the interaction of protein-protein *in vitro*.

Key words: *Monascus ruber*; histone deacetylase MrSir2; prokaryotic expression; enzyme activity analysis

引文格式:

郭美月, 张静, 颜青青, 等. 红色红曲菌组蛋白去乙酰化酶 MrSir2 的原核表达及活性分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(5): 163-169

GUO Mei-yue, ZHANG Jing, YAN Qing-qing, et al. Prokaryotic expression and enzyme activity analysis of histone deacetylase MrSir2 from *Monascus ruber* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 163-169

收稿日期: 2019-10-01

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31671835); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (2662018PY090)

作者简介: 郭美月 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物

通讯作者: 邵彦春 (1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物与食品生物技术

组蛋白乙酰化修饰是蛋白翻译后修饰的重要方式之一,是一个由组蛋白乙酰转移酶和组蛋白去乙酰化酶共同调控的动态可逆过程^[1],在染色质重塑和基因表达调控等方面发挥重要作用^[2]。Sir2 (silence information regulator 2) 家族是一种保守的从古细菌到哺乳动物都存在的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)依赖性的组蛋白去乙酰化酶^[3],亦可称为 sirtuin 家族。根据氨基酸序列特点, sirtuin 家族可以分为4类^[4],不同类别的 sirtuin 除了具有蛋白质去乙酰化作用外,可能还具有其他功能。

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中的 Sir2 蛋白是第一个被发现的 sirtuin 家族蛋白。之后,其它物种中的 Sir2 同源基因相继被克隆^[5]。随着对 Sir2 家族研究的深入,它们在不同生物中的功能被不断挖掘。在果蝇中, Sir2 通过激活 JNK 和 Foxo 信号通路参与调节其细胞凋亡过程^[6];拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) AtSRT1 和 AtSRT2 在其生长素信号传导中发挥作用^[7,8];水稻 (*Oryza sativa*) OsSRT1 参与维持基因组稳定性和修复 DNA 损伤,在其生长中发挥重要功能^[9];白色念珠菌 (*Candida albicans*) Sir2 介导亚端粒区域的基因组稳定性^[10];构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) SirA 调节合成次级代谢物青霉素和柄曲霉素的基因表达^[11];米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) AoHstD 与分生孢子和次级代谢产物的产生^[12]和胁迫耐受性相关^[13];酵母 Sir2 蛋白的表达水平影响了其生长速率和个体的细胞寿命^[14]。

红曲菌 (*Monascus spp.*), 又称为红曲霉^[15], 是一种小型丝状真菌, 是我国重要的药食两用微生物资源之一^[16]。红曲菌能产生丰富的代谢产物, 如食品级着色剂红曲色素 (*Monascus pigments*, MPs)^[17]、降血脂活性物质莫纳可林 K (*Monacolin K*)^[18,19]、降血压成分 γ -氨基丁酸 (GABA)^[20]、天然抗氧化成分 Dimeric acid^[21]和各种酶类^[22]等。有些红曲菌株能产生一种叫桔霉素的真菌毒素。因此, 提高有益代谢产物产率、减少或抑制有害代谢产物产生一直是红曲菌研究的重要内容。

前期研究表明 Sirtuins 家族的抑制剂二氢香豆素 (dihydrocoumarin, DHC) 影响红色红曲菌 M7 的生长以及生物量, 同时还能提高红曲色素的分泌量, 降低了真菌毒素桔霉素的产量^[23]。*mrsir2* 缺失菌株的表型与添加 DHC 的结果比较一致^[23,24], 推测 DHC 可能

通过抑制 MrSir2 蛋白发挥作用。基于此, 本研究采用 cDNA 末端快速扩增技术 (RACE) 扩增得到红曲菌 *mrsir2* 基因的 CDS, 将 *mrsir2* 基因密码子优化, 连接于携带有 His 标签的原核表达载体 pET-28b 上, 并成功诱导其在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中可溶性表达, 测定酶活性, 分析 DHC 对 Mrsir2 的抑制作用。该研究结果为分析 DHC 对红曲菌的作用机制提供了佐证, 也为研究 MrSir2 对红曲菌代谢与发育的调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与载体

红色红曲菌 M7 (*Monascus ruber* M7), 菌株 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21 (DE3), 克隆载体 pMD19-T, 原核表达载体 pET-28b。

1.1.2 酶和试剂

Nde I、*Xho* I 限制性内切酶和 T4 DNA Ligase 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 卡那霉素 (Kan) 购自美国 Amresco 公司; IPTG 购自 Biosharp 公司; PMSF 购自 Sigma 公司; DNA 凝胶回收纯化试剂盒购自北京全式金生物科技有限公司; 质粒提取试剂盒购自美国 Axygen 公司; EpigenaseTM Universal SIRT Activity/Inhibition Assay Kit (Colormetric) 购自艾美捷科技有限公司; EZ-10 DNAaway RNA 小量提取试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 抗 His 标签抗体购自北京博奥龙免疫技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 红色红曲菌 M7 总 RNA 的提取

红色红曲菌 M7 于 PDA 培养基培养 3 d, 挑取菌丝体液氮研磨提取总 RNA, 具体操作步骤参照上海生工生物科技有限公司的 EZ-10 DNAaway RNA 小量提取试剂盒。对提的总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳以验证其完整性。

1.2.2 红色红曲菌 M7 中 *mrsir2* cDNA 全长序列的获得

以红色红曲菌 M7 的总 RNA 为模板进行 cDNA 末端快速扩增, 具体方法参考邵彦春^[25]并做适当修改。所使用的引物参照表 1。

表1 *mrsir2* cDNA 全长扩增相关引物Table 1 Primers for cDNA of *mrsir2*

引物	序列 5'→3'	功能
GSP1	GTACCAGCACCAACGGAGAGAG	扩增 cDNA 序列中间片段的特异引物
GSP2	TGATGCTGTGAAATTACTCCGAG	扩增 cDNA 序列中间片段的特异引物
3'OligodT	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCA	扩增 3'末端 cDNA 序列的锚定引物
3'GSP1	CTCAGTCTCTTTACGAAGATGCT	扩增 3'末端 cDNA 序列的特异引物
3'GSP2	GGATTCTACCACCAGCGTTTCTC	扩增 3'末端 cDNA 序列的特异引物
3'接头引物	GATACGCTACGTAACGGCATGACAG	扩增 3'末端 cDNA 序列的锚定引物
5'接头引物	GACTCGAGTCGACATCGA(C) ₁₇	扩增 5'末端 cDNA 序列的锚定引物
5'GSP1	GCATCAGTAACAGAATTGTACCG	扩增 5'末端 cDNA 序列的特异引物
5'GSP2	ATTCAGACTGCGATACTTCCTCCGC	扩增 5'末端 cDNA 序列的特异引物

1.2.2.1 扩增 *mrsir2* 基因中间部分的 cDNA 序列

以出发菌株 M7 总 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 获得 cDNA 第一条链。以 *sir2* 基因的保守序列为模板设计两条特异性引物 GSP1 和 GSP2, 以 RT-PCR 反应产物为模板进行常规 PCR 扩增, 获得 *mrsir2* 中间部分的 cDNA 双链。PCR 产物经凝胶纯化试剂盒纯化回收后, 与 pMD19-T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞后菌落 PCR 验证阳性转化子并提取质粒, 将验证正确的质粒送由上海生工生物科技有限公司测序, 并分析测序结果。

1.2.2.2 扩增 *mrsir2* 基因 3'末端的 cDNA 序列

以出发菌株 M7 总 RNA 为模板, 3'OligodT 寡核苷酸单链为锚定引物进行 RT-PCR 扩增, 获得 3'末端的第一条 cDNA 链。

根据 1.2.2.1 中间部分 cDNA 双链的测序结果, 设计了两条特异性引物 3'GSP1 和 3'GSP2。先以 RT-PCR 反应产物为模板, 3'GSP1 和锚定引物 3'Oligod T 组成引物对进行 PCR 扩增, 获得 *mrsir2* 基因 3'末端的 cDNA 双链。

为进一步验证 PCR 反应的特异性并增加产物的量以便于回收, 以上述 PCR 反应产物为模板, 3'GSP2 和 3'接头引物组成引物对进行 PCR 扩增, PCR 扩增产物经凝胶纯化试剂盒纯化回收后, 与 pMD19-T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞后菌落 PCR 验证阳性转化子并提取质粒, 将验证正确的质粒送由上海生工生物科技有限公司测序, 并分析测序结果。

1.2.2.3 扩增 *mrsir2* 基因 5'末端的 cDNA 序列

RT-PCR 扩增 5'方向第一条 cDNA 链: 以 M7 总 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 获得 5'末端的第一条 cDNA 链。得到 RT-PCR 产物, 然后对得到的 RT-PCR 产物进行纯化处理。

RT-PCR 纯化产物加尾: 取纯化后的 RT-PCR 产物 10 μ L, 加尾体系如下: RT-PCR 纯化产物 10.0 μ L,

5 $\times$ TdT Buffer 10.0 μ L, 0.1% BSA 5.0 μ L, dGTP(100 mM) 2.5 μ L, TdT(14 U/ μ L) 1.0 μ L, ddH₂O 21.5 μ L。上述体系 37 $^{\circ}$ C 反应过夜 (约 12 h), 加入 5 μ L 的 5 mol/L NaCl 和 1 μ L 的 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 结束反应, 对加尾产物进行纯化。

PCR 扩增 5'末端 cDNA 双链: 根据 1.2.2.1 中间部分 cDNA 双链的测序结果, 设计两条特异性反向引物 5'GSP1 和 5'GSP2。先以纯化的 RT-PCR 加尾产物为模板, 5'GSP1 与 5'接头引物组成引物对进行 PCR 扩增, 获得 *mrsir2* 基因 3'末端的 cDNA 双链。为进一步验证 PCR 反应的特异性并增加产物的量以便于回收, 以上述 PCR 反应产物为模板, 5'GSP2 与 5'接头引物组成引物对进行 PCR 扩增。

PCR 扩增产物经凝胶纯化试剂盒纯化回收后, 与 pMD19-T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞后菌落 PCR 验证阳性转化子并提取质粒, 将验证正确的质粒送由上海生工生物科技有限公司测序, 并分析测序结果。

1.2.2.4 cDNA 片段的拼接及特征分析

对获得的三段双链 cDNA 序列的测序结果进行拼接, 采用在线软件 ProtParam 分析 MrSir2 蛋白的理化性质; TMpred 分析跨膜区; SingalP 分析信号肽; Pfam 分析预测保守结构域。

1.2.3 红曲菌 MrSir2 蛋白的异源表达

1.2.3.1 重组表达载体的构建

参照大肠杆菌的密码子偏好性, 在不改变氨基酸序列的前提下, 对 *mrsir2* 基因进行密码子优化。采用 *Nde* I 和 *Xho* I 两种限制性内切酶对优化后的 *mrsir2* 序列和 pET-28b 载体进行双酶切, 酶切后的正确条带切胶回收纯化, 然后用 T4 DNA ligase 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在含卡那霉素 (Kan) 的 LB 平板上筛选阳性克隆, 对阳性克隆提取质粒进行 PCR 和酶切验证, 由生工生物公司进行测序分析。

1.2.3.2 阳性转化子的鉴定

将测序正确的阳性克隆质粒转化表达菌株 *E.coli* BL21 (DE3), 在含卡那霉素 (Kan) 的 LB 平板上筛选阳性克隆, 菌落 PCR 验证, 将正确的阳性单克隆扩大培养后保存。

1.2.3.3 重组蛋白的诱导表达及条件优化

将上述鉴定结果呈阳性的菌液取适量接种于含卡那霉素 (Kan, 50 $\mu\text{g/mL}$) 的 LB 培养基中过夜振荡培养, 按 1:100 的接种比例转接, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8, 取出 1 mL 为阴性对照, 其他样品加入终浓度为 1 mM 的 IPTG, 分别放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 28 $^{\circ}\text{C}$ 诱导培养 4 h, 16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导培养 16 h, 12000 g 离心收集 3 mL 菌体, 去上清, 菌体用 400 μL PBS 和 4 μL 100 mM 的 PMSF 重悬, 超声破碎后, 12000 g 离心 10 min, 取上清, 沉淀用 200 μL PBS, 2 μL 100 mM 的 PMSF 和 8 M 尿素溶解, SDS-PAGE 分析上清和沉淀。

加入终浓度为 0.25 mM、0.5 mM、0.75 mM、1.0 mM、1.25 mM 的 IPTG, 与不添加 IPTG 诱导剂的样品为对照。按照最佳的诱导温度和时间进行诱导, 以确定 IPTG 最佳诱导浓度。

1.2.3.4 目的蛋白的纯化

根据小量表达的结果, 选取表达最优的表达条件, 扩大培养菌体, 提取纯化蛋白, 具体过程为: 12000 g 离心收集诱导的菌体, 用 5 mM 的 Binding buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-base, 5 mM 咪唑) 重悬, 12000 g 离心 10 min, 重复洗涤一次, 收集菌体。将收集的菌体用 100 mL 5 mM 的 Binding buffer 和 1 mL 100 mM 的 PMSF 重悬, 用低温超高压细胞破碎仪进行破碎, 反复 2~3 次, 直至澄清, 离心取上清, 用 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 滤膜过滤, 进行 Ni²⁺亲和层析纯化。

1.2.3.5 Western blot 鉴定目的蛋白

将纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 将目的条带切下, 裁剪与胶大小一致的 PVDF 膜, 进行转膜; 转膜结束之后加入 5~10 mL 封闭液在摇床上缓慢摇动, 室温封闭 1~2 h; 用封闭液按比例稀释一抗, 室温在侧摆摇床上缓慢摇动孵育 3 h, 再加入 TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min; 用封闭液按比例稀释二抗, 室温在侧摆摇床上缓慢摇动孵育 40 min, 再加入 TBST 漂洗 3 次, 每次 15 min; 然后滴加 ECL 工作液使其将膜片完全覆盖, 根据实际荧光强度选择合适曝光时间显影。

1.2.3.6 MrSir2 的酶活鉴定及其与 DHC 的关系

利用艾美捷 Epigenase Universal SIRT Activity/Inhibition Assay Kit (Colorimetric) 测定目的蛋白酶活及 DHC 对目的蛋白酶活的抑制效果。NNC

组 (No NAD Control, 不添加 NAD 的阴性对照)、不添加 DHC 的样品组 (Sample Without Inhibitor) 和添加 DHC 的样品组 (Sample With Inhibitor) 分别设置两个平行, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60~90 min, 反应结束测量 OD_{450nm}, 酶活计算公式如下:

$$\text{SIRT Activity (OD / min / mg)} = \frac{(\text{Sample OD} - \text{NNC OD})}{(\text{Protein Amount } (\mu\text{g}) * \text{min} **)} \times 1000 \quad (1)$$

式中: *反应过程中加入的蛋白总量 (μg); **在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育的时间 (min)。

酶活抑制率计算公式如下:

$$\text{Inhibition \%} = \left[1 - \frac{\text{Inhibitor Sample OD} - \text{NNC OD}}{\text{No Inhibitor Sample OD} - \text{NNC OD}} \right] \times 100\% \quad (2)$$

1.2.4 数据处理

采用 GraphPad 软件对数据进行处理与作图。

2 结果与分析

2.1 红色红曲菌 M7 中 *mrsir2* 的 cDNA 全长序列的获得

2.1.1 红色红曲菌 M7 总 RNA 的提取

选用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测红色红曲菌 M7 总 RNA 提取质量, 电泳结果如图 1 所示, 可以看到 28 S 和 18 S 这两条清晰的条带, 且 28 S 条带亮度约为 18 S 条带的两倍, 说明提取的 RNA 较完整, 可用于后续实验。

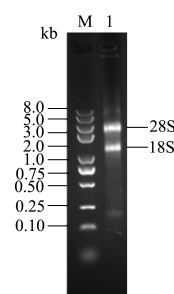
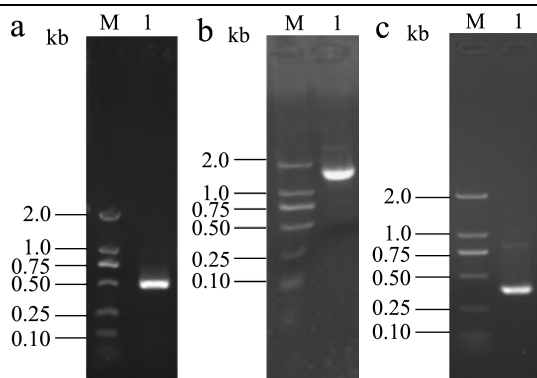


图 1 红色红曲菌 M7 的总 RNA 电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of RNA isolated from *Monascus ruber* M7

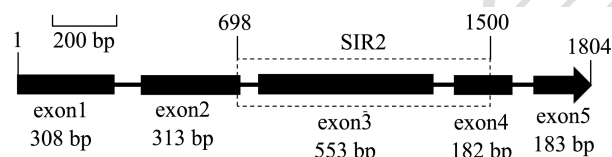
2.1.2 *mrsir2* cDNA 序列的扩增及其结构特性分析

分别根据 1.2.2.1~1.2.2.3 中的方法, 扩增获得 *mrsir2* 中间部分以及 3'端和 5'端的 cDNA 序列。扩增得到的各序列片段结果见图 2a-2c。PCR 产物纯化回收测序结果表明大小分别为 558 bp、1580 bp、329 bp, 与琼脂糖凝胶电泳结果相符。

图2 *mrsir2* 全长 cDNA 序列的扩增Fig.2 Amplification of the full-length cDNA sequence of *mrsir2*

注: a: *mrsir2* 基因中间的 cDNA 序列 PCR 结果; b: *mrsir2* 基因 3' 末端的 cDNA 序列 PCR 结果; c: *mrsir2* 基因 3' 末端的 cDNA 序列 PCR 结果。

将 *mrsir2* 的中间 cDNA 序列、3' 末端 cDNA 序列和 5' 末端 cDNA 序列的测序结果进行拼接, 得到了全长为 2019 bp 的 cDNA 序列。通过在线预测软件 ORF finder 对红色红曲菌 M7 的 *mrsir2* 基因的 cDNA 序列分析, 其 CDS 长 1539 bp, 编码 512 个氨基酸。将 *mrsir2* 的 CDS 与 DNA 序列比对分析发现, *mrsir2* 的 DNA 序列长 1804 bp, 被四个内含子隔开, 分别长 85 bp、60 bp、59 bp 和 61 bp。MrSir2 理论蛋白大小为 56.6 ku, 等电点为 5.14, 是亲水性蛋白, 无信号肽和跨膜区。Pfam 分析显示 MrSir2 氨基酸序列中含有一个 SIR2 的保守结构域 (图 3)。

图3 *mrsir2* 基因结构示意图Fig.3 The gene structure diagram of *mrsir2*

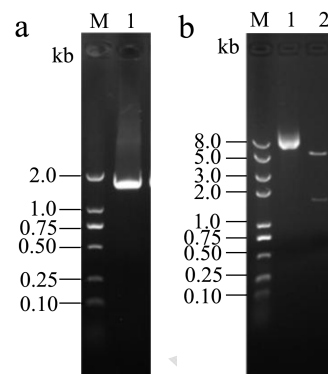
注: exon: 外显子; 虚线方框代表 MrSir2 的保守结构域。

2.2 组蛋白去乙酰化酶 MrSir2 的异源表达

2.2.1 表达载体 pET-28b-*mrsir2* 的构建

优化后的 *mrsir2* 序列和 pET-28b 载体经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切、纯化后连接, 并转化 *E.coli* DH5a 感受态, 37 °C 培养过夜, 挑取阳性克隆子后进行 PCR 鉴定。PCR 扩增 *mrsir2* 基因的产物经电泳检测, 可见一条与预期结果大小相符的 DNA 条带 (图 4a)。PCR 鉴定为正确的克隆子培养过夜, 提取重组质粒, 经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 结果显示有两条大小分别约为 5200 bp 和 1600 bp 的条带 (图 4b), 这与载体和目的基因 *mrsir2* 大小相符, 并且测序结果证明 *mrsir2* 序列是正确的。验证正

确的重组质粒转入 *E.coli* BL21, 用于后续目的蛋白的表达。

图4 载体 pET-28b-*mrsir2* 的构建Fig.4 The construction of pET-28b-*mrsir2* vector

注: a: 目的基因 *mrsir2* 切胶回收验证电泳图; b: pET-28b-*mrsir2* 载体质粒双酶切鉴定。

2.2.2 MrSir2 蛋白表达条件的优化

为了获得可溶性蛋白, 对 IPTG 诱导温度进行优化, 重组菌体分别在 16 °C 诱导培养 16 h, 28 °C 诱导培养 4 h, 37 °C 诱导培养 4 h。离心诱导培养后的菌液, 收集菌体, 并用 PBS 和 PMSF 重悬菌体后进行超声破碎, 对菌体破碎液离心, 分别得到上清和沉淀。其中, 沉淀用 PBS、PMSF 和 8M 尿素溶解。与对照相比, 16 °C 时, 目的蛋白几乎全部分布在上清中表达, 37 °C 时, 上清中的目的蛋白含量很低, 大量以包涵体融合蛋白的形式表达, 28 °C 时上清中目的蛋白的表达量少于 16 °C, 多于 37 °C。故确定 16 °C 为融合蛋白可溶性表达的最佳诱导温度。具体结果见图 5。

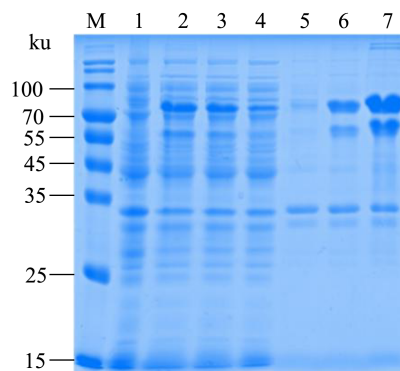


图5 重组蛋白 MrSir2 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.5 SDS-PAGE electrophoresis for recombinant protein

MrSir2

注: M: 蛋白分子量标准; 泳道 1: 对照 (BL21 菌株未经诱导); 泳道 2: 16 °C 诱导 16 h 的上清液; 泳道 3: 28 °C 诱导 4 h 的上清液; 泳道 4: 37 °C 诱导 4 h 的上清液; 泳道 5: 16 °C 诱导 16 h 的沉淀; 泳道 6: 28 °C 诱导 4 h 的沉淀; 泳道 7: 37 °C 诱导 4 h 的沉淀。

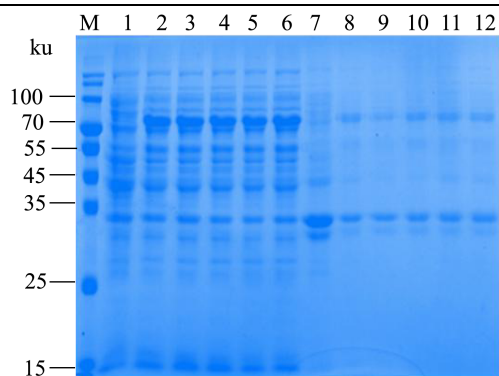


图6 重组蛋白 MrSir2 的 IPTG 诱导浓度优化 SDS-PAGE 电泳图

Fig.6 SDS-PAGE electrophoresis for the optimization of IPTG induced concentration of recombinant protein MrSir2

注: M: 蛋白分子量标准; 泳道 1~6: IPTG 诱导浓度为 0 mM、0.25 mM、0.5 mM、0.75 mM、1.0 mM、1.25 mM 的上清; 泳道 7~12: IPTG 诱导浓度为 0 mM、0.25 mM、0.5 mM、0.75 mM、1.0 mM、1.25 mM 的沉淀。

目的蛋白在 16 °C 时在上清中主要以可溶性表达方式表达, 为进一步优化 IPTG 的诱导浓度, 分别在 LB 培养液中加入终浓度为 0.25 mM、0.5 mM、0.75 mM、1.0 mM、1.25 mM 的 IPTG, 以不加 IPTG 的菌体为对照, 用 PBS 和 PMSF 重悬收集的菌体, 超声破碎后离心, 取上清, 沉淀用 PBS、PMSF 和 8 M 尿素溶解。结果如图 6 所示, 与对照相比, 在不同浓度 IPTG 的诱导下, 目的蛋白的表达量都很高, 且无明显差异。因此, 选择 IPTG 终浓度为 0.25 mM 对重组蛋白进行诱导。

2.2.3 MrSir2 蛋白的纯化

根据目的蛋白表达条件的优化结果, 扩大至 1 L 菌液进行诱导培养, 收集 16 °C 诱导培养 16 h 的菌体, 低温超高压细胞破碎仪破碎后收集上清液, 利用 Ni^{2+} 亲和层析纯化蛋白。纯化结果如图 7。图 7 中泳道 3、4、5 纯化蛋白的浓度分别达到 0.87、1.01、1.97 mg/mL。

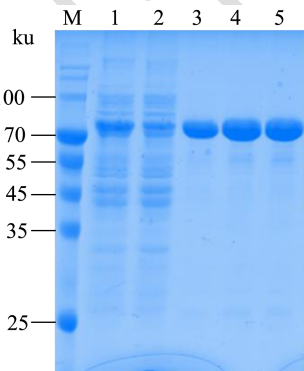


图7 目的蛋白 MrSir2 纯化 SDS-PAGE 电泳图

Fig.7 SDS-PAGE electrophoresis for purified target protein

MrSir2

注: M: 蛋白分子量标准; 泳道 1: 破碎上清液; 泳道

2: 镍柱穿透液; 泳道 3~5: 纯化后的目的蛋白。

2.2.4 MrSir2 蛋白的 Western blot 鉴定结果

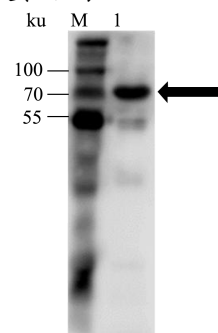


图8 重组蛋白 Western blot 鉴定

Fig.8 Western blot identification of recombinant protein

为了进一步对诱导蛋白的正确性进行验证, 对携带 His 标签的 MrSir2 蛋白进行 Western blot 实验。结果见图 8。由图可见, 重组蛋白在约 75 ku 分子量大小的位置有一条清晰的杂交印迹, 表明重组蛋白能被 His 标签抗体识别, 重组蛋白表达是成功的。从图中杂交带位置大小来看, 略大于预测的 56.6 ku, 可能与 MrSir2 蛋白氨基酸序列中带负电荷氨基酸较多、蛋白整体偏酸性、在电泳条件下结合了较少的 SDS 使其电泳速率较正常情况慢有关。

2.2.5 MrSir2 蛋白的酶活鉴定及其与 DHC 的关系

将在大肠杆菌中异源表达的 MrSir2 蛋白纯化后, 检测其活性及 DHC 对 MrSir2 蛋白的抑制效果。从图 9a 可以看出显色反应明显, 相比于 NNC 组, 不添加 DHC 的样品组颜色变黄, 加入 DHC 后, 颜色变浅。图 9b 结果显示样品组在 450 nm 处的 OD 值比 NNC 组显著上升 ($p < 0.01$), 相比与不添加 DHC 的样品组, 加入 DHC 的样品组在 450 nm 处的 OD 值降低。检测 MrSir2 酶活性为 78.5 (OD/min/mg), 酶活性较高, 780 μM 的 DHC 对 MrSir2 蛋白的酶活抑制率为 47%。

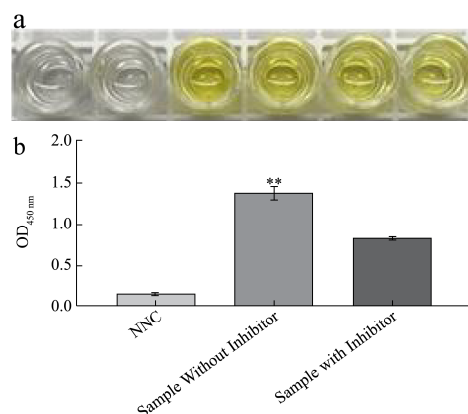


图9 MrSir2 蛋白的酶活鉴定及其与 DHC 的关系

Fig.9 Enzyme activity identification and relationship with DHC of MrSir2 protein

注: 图 a: MrSir2 蛋白酶活反应实验及 DHC 对 MrSir2 蛋白的抑制实验; 图 b: NNC 组、不添加 DHC 的样品组和添加 DHC 的样品组 OD_{450 nm} 分析。图 a 中前两个孔为 NNC 组 (不添加 NAD 的阴性对照), 中间两个孔为不添加 DHC 的样品组 (Sample Without Inhibitor), 后两个孔为添加 DHC 的样品组 (Sample With Inhibitor), 检测条件和结果如下: 蛋白加样量为 0.25 μ g, 780 μ M 的 DHC 添加 5 μ L, 反应条件: 37 $^{\circ}$ C 反应 60 min; 图 b 中**表示与 NNC 组相比 $p < 0.01$ 。

3 结论

Sir2 是一种从古细菌到哺乳动物都存在的 NAD⁺ (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸) 依赖的组蛋白去乙酰化酶, 广泛参与调节细胞的基因表达、细胞周期、基因组稳定性、细胞老化与凋亡、初级和次级代谢等多种生命活动。Sir2 既有结构和功能的保守性, 在不同生物体中也存在功能的差异性。红曲菌是我国重要的药食两用微生物资源, 尚未见 Sir2 对其代谢和发育调控的研究。本研究利用 RACE 技术得到了红色红曲菌 M7 的 cDNA 全长序列, 以此为基础, 通过密码子优化, 将其连接于 pET-28b, 得到 pET-28b-mrsir2 重组载体, 并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中实现了可溶性的高效表达, 表达的蛋白具有良好的组蛋白去乙酰化酶活性。这为进一步研究红曲菌中 Sir2 同源蛋白 MrSir2 底物多样性、酶学性质及其在红曲菌中的调控作用机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Pfannenstiel B T, Keller N P. On top of biosynthetic gene clusters: How epigenetic machinery influences secondary metabolism in fungi [J]. *Biotechnol Adv*, 2019
- [2] 曹端方, 杨娜. 组蛋白去乙酰化酶的结构及应用 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2015, 11: 978-993
- [3] CAO Rui-fang, YANG Na. Structure and application of histone deacetylase [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2015, 11: 978-993
- [4] Frye R A. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast *SIR2* gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 260(1): 273-279
- [5] Frye R A. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 273(2): 793-798
- [6] 霍晓芳, 张俊武. Sirtuin: 依赖 NAD⁺ 的去乙酰化酶 [J]. *生命的化学*, 2005, 25(3): 181-184
- [7] HUO Xiao-fang, ZHANG Jun-wu. Sirtuin: NAD⁺-dependent deacetylase [J]. *Chemistry of Life*, 2005, 25(3): 181-184
- [8] Griswold A J, Chang K T, Runko A P, et al. Sir2 mediates apoptosis through JNK-dependent pathways in *Drosophila* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(25): 8673-8678
- [9] Hollender C, Liu Z C. Histone deacetylase genes in *Arabidopsis* development [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50(7): 875-885
- [10] Grozinger C M, Chao E D, Blackwell H E, et al. Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(42): 38837-38843
- [11] Huang L M, Sun Q W, Qin F J, et al. Down-regulation of a silent information regulator2-related histone deacetylase gene, OsSRT1, induces DNA fragmentation and cell death in rice [J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(3): 1508-1519
- [12] Freire-beneitez V, Gourlay S, Berman J, et al. Sir2 regulates stability of repetitive domains differentially in the human fungal pathogen *Candida albicans* [J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(19): 9166-9179
- [13] Itoh E, Shigemoto R, Oinuma K I, et al. Sirtuin a regulates secondary metabolite production by *Aspergillus nidulans* [J]. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2017, 63(4): 228-235
- [14] Kawauchi M, Nishiura M, Iwashita K. Fungus-specific sirtuin HstD coordinates secondary metabolism and development through control of LaeA [J]. *Eukaryotic Cell*, 2013, 12(8): 1087-1096
- [15] Kawauchi M, Iwashita K. Functional analysis of histone deacetylase and its role in stress response, drug resistance and solid-state cultivation in *Aspergillus oryzae* [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 118(2): 172-176
- [16] Smith J T, W W J, Huzefa D, et al. Yeast lifespan variation correlates with cell growth and *SIR2* expression [J]. *Plos One*, 2018, 13(7): e0200275
- [17] 李钟庆, 郭芳. 红曲菌的形态与分类学 [M]. 2003
- [18] LI Zhong-qing, GUO Fang. Morphology and Taxonomy of *Monascus* [M]. 2003

(下转第 72 页)