

限制性内切酶 *NcoI* 的高效重组表达、硒代与结晶条件初步筛选

程 艺^{1,2}, 马 超^{1,2}, 陈晓雨^{1,2}, 邵钰晨^{1,2}, 王 潇^{1,2},
杨雪丽^{1,2}, 苏 蓉^{1,2}, 李婷婷^{*1,2}

(1. 江苏海洋大学 江苏省海洋药物活性分子筛选重点实验室, 江苏 连云港 222005; 2. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏 连云港 222005)

摘要: 来源于珊瑚诺卡氏菌 *Nocardia corallina* 的限制性内切酶 *NcoI* 是基因工程中常用的工具酶之一。然而目前 *NcoI* 蛋白质三维结构尚未被解析, 对其基因改造缺乏理论指导。为了解析 *NcoI* 的三维结构, 采用大肠杆菌表达系统, 高效重组表达和纯化, 获得了纯度>95%的 *NcoI* 野生型和 Se-*NcoI* 硒代蛋白。质谱分析表明, 重组 Se-*NcoI* 蛋白中所有硫原子成功被硒原子取代。酶切实验表明, 硒代蛋白与野生型具有相似的限制酶活性。采用坐滴法筛选重组 *NcoI* 蛋白结晶条件, 已在 3 种条件下获得针状晶体, 1 种条件下获得颗粒状晶体。X 射线衍射初步分析晶体分辨率在 0.8 nm 左右, 为下一步解析 *NcoI* 三维结构提供了基础。

关键词: 限制性内切酶; *NcoI*; 表达纯化; 硒代; 结晶

中图分类号: Q 819 文章编号: 1673-1689(2021)07-0081-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.07.010

High Efficient Recombinant Expression of Endonuclease *NcoI* Selenoprotein and Preliminary Screening of Protein Crystallization Conditions

CHENG Yi^{1,2}, MA Chao^{1,2}, CHEN Xiaoyu^{1,2}, SHAO Yuchen^{1,2}, WANG Xiao^{1,2},
YANG Xueli^{1,2}, SU Rong^{1,2}, LI Tingting^{*1,2}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Pharmaceutical Compound Screening, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 2. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-Industry Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: Type II restriction endonuclease *NcoI* derived from *Nocardia corallina* is one of the enzymes commonly used in genetic engineering. However, the three-dimensional structure of *NcoI* has not been determined, and there is no theoretical guidance for the genetic modification of *NcoI*. To analyze the crystal structure of *NcoI*, wild-type *NNcoI* and its selenoprotein Se-*NcoI* with purity > 95% were obtained by high efficient recombinant expression and purification using *E. coli* system. Mass spectrometric analysis showed that all sulfur atoms in Se-*NcoI* were successfully substituted by selenium atoms. Enzyme digestion experiments showed that selenoproteins had similar restriction

收稿日期: 2020-02-16

基金项目: 江苏省高等学校自然科学研究面上项目(19KJB210008)

* 通信作者: 李婷婷(1987—), 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事蛋白质晶体结构解析和配体筛选方面的研究。

E-mail: litt@jou.edu.cn

enzyme activity with the wild-type. The crystallization conditions of wild type *NcoI* were screened by sitting-drop method. Needle-like crystals were grown in three conditions and granular crystals were grown in another condition. A set of data with a resolution of 0.8 nm was collected by preliminary X-ray diffraction analysis, which provided a basis for further analysis of the three-dimensional structure of *NcoI*.

Keywords: restriction endonuclease, *NcoI*, expression and purification, selenoprotein, crystallization

限制性核酸内切酶(简称“限制酶”)是现代基因工程中最基础的一大类工具酶^[1]。天然来源的限制酶往往具有星号活性(即在非理想条件下限制酶的专一性发生改变)较强、反应缓冲体系不一致等缺陷,所以研究者对限制酶的研究和改造一直没有停止^[2]。不同限制酶之间的序列同源性很低,基本无法通过同源序列分析来确定核心催化位点,因此解析限制酶蛋白质的三维结构和阐明限制酶的分子机制对后续定向改造具有重要的指导意义^[3-4]。然而,尽管目前已经发现了数千种限制酶,被商业应用的限制酶也达到 300 种左右,但迄今为止仅有 50 余种限制酶的三维结构得到解析^[5-8]。

大多数限制酶蛋白质相对分子质量小于 70 000,适合采用 X 射线晶体衍射法解析三维结构^[9-10]。由于限制酶具有切割 DNA 的特性,在对其进行重组表达时往往会使宿主 DNA 被切割,造成宿主菌的死亡,因此需要利用该限制酶对应的甲基化酶对宿主 DNA 进行保护,从而获得重组限制酶的大量表达^[11]。另一方面,由于限制酶彼此之间序列同源性低,无法参考已有的限制酶晶体结构,使用分子置换法来推算晶体衍射的相位,只能采用同晶置换法或反常散射法^[12]。同晶置换法需要制备大量蛋白质晶体来摸索制备重原子衍生物的浸泡条件。反常散射法在重组表达时制备蛋白硒代衍生物,通过在多个波长下收集硒原子边缘的反常散射及其附近的衍射数据,从而推算晶体衍射相位^[13-14]。虽然硒元素对蛋白质的诱导及稳定性均会产生不同程度的影响,硒代的效率也受诸多因素干扰^[15],但由于其操作方便,研究时会首先选择反常散射法。目前在大肠杆菌中表达硒代蛋白可以选择甲硫氨酸缺陷型表达菌株,或者阻断甲硫氨酸合成通路,利用外源硒代甲硫氨酸获得硒代蛋白。

NcoI 是一种来源于珊瑚诺卡氏菌 *Nocardia corallina* 的 Type II 类限制酶,是常用的限制酶之一,迄今为止尚未有三维结构和分子机制相关的报

道。作者利用大肠杆菌表达系统,重组表达了野生型 *NcoI* 蛋白质和硒代 *NcoI* 蛋白质,并尝试以坐滴法筛选晶体生长条件,为下一步解析 *NcoI* 的三维结构、阐明其分子机制和定向改造提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

BL21 (DE3)pLysS、B834 (DE3)pLysS 和 pET-28b 质粒载体:购自武汉森灵生物科技有限公司;λDNA、无缝克隆试剂盒等分子生物学试剂:购自莫纳(武汉)生物科技有限公司;Ni 亲和层析基质(Toyo pearl AF):购自东曹(上海)生物科技有限公司;UniGel-80Q:购自江苏纳微生物科技有限公司;HiLoad 16/60 Superdex 75pg 凝胶过滤预装柱:购自美国 GE 公司;蛋白胨、酵母粉、琼脂糖:购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;蛋白质结晶条件筛选试剂盒:购自美国 Hampton Research 公司;其余化学试剂均为国药分析纯。JN-02 细胞高压破碎仪:购自广州聚能生物科技有限公司;Beckman Avanti J-26s XP 离心机:购自 Beckman 公司;Invitrogen Qubit 4 荧光计:购自 Thermo Fisher Scientific 公司;恒温晶体生长拍照仪:购自美国 Formulatrix 公司。

1.2 方法

1.2.1 *NcoI* 重组蛋白的载体构建 编码 II 型限制性内切酶 *NcoI* 的基因序列(UniProt ID:O85489)和甲基化酶 *NcoIM* 的基因序列(UniProt ID:A0A077QMR0)经人工合成,同时克隆至一个目标载体 pET-28b。将重组质粒 pET28b-*NcoI* 通过热激转化法分别导入 BL21 (DE3) pLysS 和 B834(DE3) pLysS 感受态细胞。因为 pET-28b 载体上带有卡那霉素的抗性基因,而两种表达菌株 BL21 (DE3) pLysS 和 B834(DE3)pLysS 均自带氯霉素抗性基因,所以经卡那霉素和氯霉素双抗性 LB 平板筛选,获得 *NcoI* 重组表达菌株 BL21 (DE3) pLysS-*NcoI* 和 B834(DE3)pLysS-*NcoI*。

1.2.2 *NcoI* 重组蛋白及其酶代蛋白的发酵 *NcoI* 重组蛋白的发酵:菌株 BL21 (DE3) pLysS-*NcoI* 接种在 LB 培养基中,经活化和扩大培养至 OD_{600 nm} 为 0.6~0.8,分别于 16、37 °C 加入 IPTG 诱导表达, IPTG 浓度分别为 0.1、0.5、1.0 mmol/L 进行最佳表达条件优化。酶代 *NcoI* 重组蛋白的发酵:菌株 BL21 (DE3) pLysS-*NcoI* 或者 B834 (DE3)pLysS-*NcoI* 在过渡培养基 (LB 培养基与 M9 培养基比例为 2:8) 中扩大培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8,后转移菌体至 M9 培养基中,补加酶代甲硫氨酸至质量浓度为 0.05 g/L,在 37 °C 适应性培养 15 min,于 16 °C 加入 IPTG (0.5 mmol/L) 诱导表达 16 h。菌株 BL21 (DE3) pLysS-*NcoI* 在过渡培养基中扩大培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8,后转移菌体至 M9 培养基中,补加苯丙氨酸、苏氨酸、赖氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸至各质量浓度为 0.1 g/L,酶代甲硫氨酸 0.05 g/L,在 37 °C 适应性培养 15 min,于 16 °C 加入 IPTG (0.5 mmol/L) 诱导表达 16 h。

1.2.3 *NcoI* 重组蛋白及其酶代蛋白的分离纯化 收集发酵菌体,用裂解缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 300 mmol/L NaCl) 重悬菌体并进行高压破碎,然后在 4 °C 下于 14 000 r/min 离心 30 min,收集上清液。上清液经镍亲和层析法初步纯化后,进行 SDS-PAGE 验证是否有目的蛋白质表达条带,然后用阴离子交换层析柱 UniGel-80Q 进一步纯化。最后蛋白质经 HiLoad 16/60 Superdex 75pg 凝胶过滤预装柱分离,收集相应组分浓缩,进行 SDS-PAGE 验证。蛋白质质量浓度由 Invitrogen Qubit 4 荧光计精准测定。整个纯化过程需要低温环境。

1.2.4 *NcoI* 蛋白及其酶代蛋白的质谱检测 采用 Agilent 6530 精确质量四极杆飞行时间 (Q-TOF) 液质联用系统 (美国 Agilent Technologies 公司) 对 *NcoI* 重组蛋白 (1.5 mg/mL) 和其酶代蛋白 (1.5 mg/mL) 进行分析鉴定。HPLC 分离条件:使用 Agilent Zorbax C18 色谱柱,流动相是 $V_{\text{乙醇}}:V_{\text{水}}:V_{\text{甲酸}}$ 为 2.0:98.0:0.1,柱温 40 °C,流量 1 mL/min,进样量 20 μ L。质谱检测条件:电喷雾正离子扫描 (ESI+),离子源温度 325 °C,毛细管电压 3.5 kV,每隔 0.33 s 采集一次图谱,质量扫描范围 m/z 为 680~1 140。质谱检测由中国科学院武汉物理与数学研究所完成。

1.2.5 *NcoI* 蛋白及其酶代蛋白的酶活检测 取 *NcoI* 蛋白 (10 μ g/ μ L) 和酶代蛋白 (10 μ g/ μ L) 各

1 μ L,均以 0.3 μ g λ DNA 为底物,使用 CutOne 缓冲液 (莫纳 (武汉) 生物科技有限公司) 配制成 20 μ L 反应体系,37 °C 温育 15 min,随即高温失活,1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测底物的酶切结果。

1.2.6 *NcoI* 蛋白及其酶代蛋白结晶条件初筛 利用坐滴法对 10 种蛋白质结晶条件筛选试剂盒 (Crystal Screen HR2-112、Crystal Screen Lite HR2-128、Crystal Screen HR2-110、Crystal Screen 2 HR2-112、Index-HR2-144、StatRx-HR2-107、SaltRx 2-HR2-109、Natrix-HR2-116、PEG Rx1-HR2-082、PEG Rx2-HR2-084) 进行初筛。*NcoI* 重组蛋白 (纯度 >95%) 浓缩至 10 mg/mL,将蛋白质溶液与结晶试剂按 1:1 比例混合,置于 20 °C 恒温晶体生长拍照仪中,每隔 12 h 拍照记录晶体生长情况。

2 结果与分析

2.1 重组表达载体构建

限制性内切酶 *NcoI* 特异性识别和切割 CCATGG 位点,因此在大肠杆菌中重组表达会严重损害宿主 DNA。为避免重组表达的 *NcoI* 蛋白质对宿主的伤害,同时表达了 *NcoI* 的甲基化酶 (*NcoIM*),可以识别并甲基化 *NcoI* 的切割位点,被甲基化的 DNA 特异性识别位点受到保护,从而避免限制性内切酶的切割。在载体 pET-28b 上同时构建了 *NcoI* 编码基因和 *NcoIM* 编码基因,*NcoI* 编码基因 N 端带有 6xHis 标签序列,见图 1。将构建成功的 pET-28b (+)-*NcoI* 重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3)pLysS 以及甲硫氨酸缺陷型菌株 B834 (DE3)pLysS 感受态细胞中,筛选阳性克隆,提取质粒,经测序确定序列正确后,进行诱导表达。

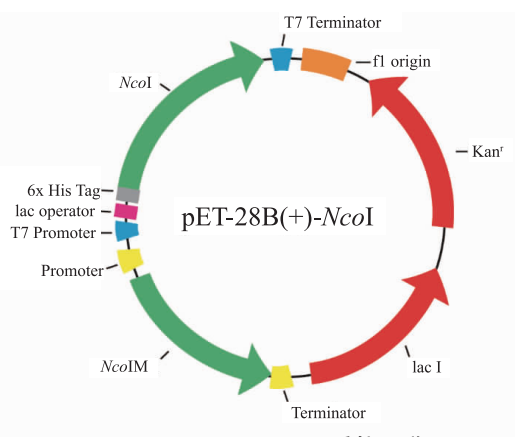


图 1 pET-28b(+)-*NcoI* 质粒图谱

Fig. 1 Schematic map of pET-28b(+)-*NcoI* plasmid

2.2 *NcoI* 重组蛋白的表达和纯化

将构建成功的重组表达质粒通过热激转化法导入 BL21(DE3)pLysS 感受态菌株中,然后涂布于卡那霉素和氯霉素双抗性的 LB 平板上,37 ℃下倒置培养 12 h 后,随机挑选若干单克隆进行目的蛋白质的小量表达试验。通过构建的重组蛋白质的氨基酸序列预测蛋白质的相对分子质量,限制性内切酶 *NcoI* 重组蛋白质的相对分子质量为 34 500,SDS-PAGE 检测不同条件下蛋白质的表达情况及表达量。结果显示,*NcoI* 重组蛋白在 16 ℃、0.5 mmol/L IPTG 诱导表达时能获得最多的可溶性蛋白质,且蛋白质大小与预期一致,后续以此条件进行蛋白质的大量表达,见表 1。

破碎后菌液上清液通过镍亲和层析后,经 SDS-PAGE 分析,目的蛋白质存在于 200 mmol/L 咪唑洗脱组分中,纯度约 80%,见图 2(a)。将含有目的

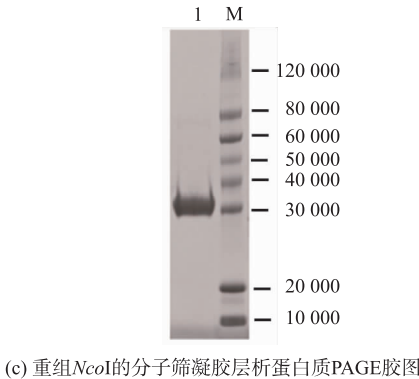
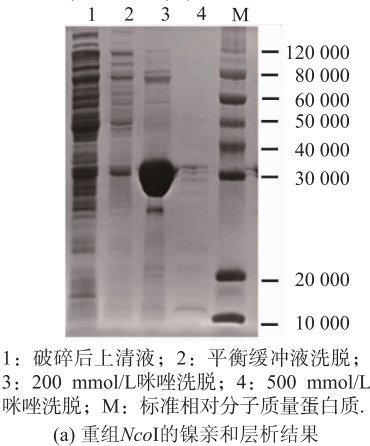


表 1 不同诱导条件下每升发酵产物 *NcoI* 重组蛋白的表达量

Table 1 Expression of recombinant protein *NcoI* per liter of fermentation product under different induction conditions

IPTG 浓度/(mmol/L)	16 ℃诱导 16 h 的表达量/(mg/L)	37 ℃诱导 3 h 的表达量/(mg/L)
0.1	4.9±0.15	5.3±0.2
0.5	7.5±0.10	6.5±0.15
1.0	6.3±0.13	6.8±0.18

蛋白质的组分进行透析除去咪唑,样品通过阴离子交换层析柱 UniGel-80Q 得到了纯度约 90%的目的蛋白质,见图 2(b)。浓缩样品后通过分子筛凝胶层析和 SDS-PAGE 进行分析,所收集目的蛋白质的纯度超过 95%,满足蛋白质结晶生长条件,见图 2(c)、(d),纯化后重组 *NcoI* 酶质量浓度约为 7.5 mg/L。

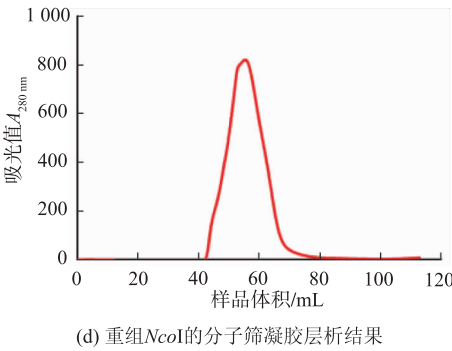
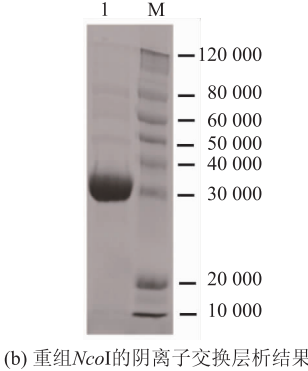


图 2 重组 *NcoI* 的表达与纯化
Fig. 2 Expression and purification of *NcoI*

2.3 *NcoI* 硒代蛋白的表达和纯化

最常用硒代蛋白培养方法是利用甲硫氨酸缺陷型菌株,在培养基中引入硒代甲硫氨酸来置换重组

蛋白质中的甲硫氨酸,其中大肠杆菌常用甲硫氨酸缺陷型菌株是 B834^[16]。因此,作者先尝试将构建成功的重组表达质粒转化导入 B834(DE3)pLysS 感受

态菌株中,并进行目的蛋白质的小量表达试验。经 SDS-PAGE 检测,未发现 *NcoI* 重组硒代蛋白 (Se-*NcoI*) 的表达条带,见图 3(a)。该实验表明,甲硫氨酸缺陷型菌株 B834 不适合同时表达 *NcoI* 重组蛋白和 *NcoIM* 重组蛋白。另外尝试利用表达 *NcoI* 重组蛋白的相同菌株 BL21(DE3) pLysS-*NcoI*,仅在发酵过程中添加了硒代甲硫氨酸、异亮氨酸等多种氨基酸,期望在抑制大肠杆菌甲硫氨酸本底合成的同

时可以更好地利用外源硒代甲硫氨酸,从而获得硒代 *NcoI*(Se-*NcoI*)蛋白质。对发酵产物的细胞裂解液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测,发现 *NcoI* 重组硒代蛋白可以高效表达,Se-*NcoI* 蛋白质经过 3 个纯化步骤:Ni 亲和层析、阴离子交换层析和分子筛凝胶层析,纯度超过 95%,Se-*NcoI* 蛋白酶质量浓度约为 6 mg/L,见图 3(b)、(c)。

重组蛋白的表达过程对外源添加的硒代甲硫

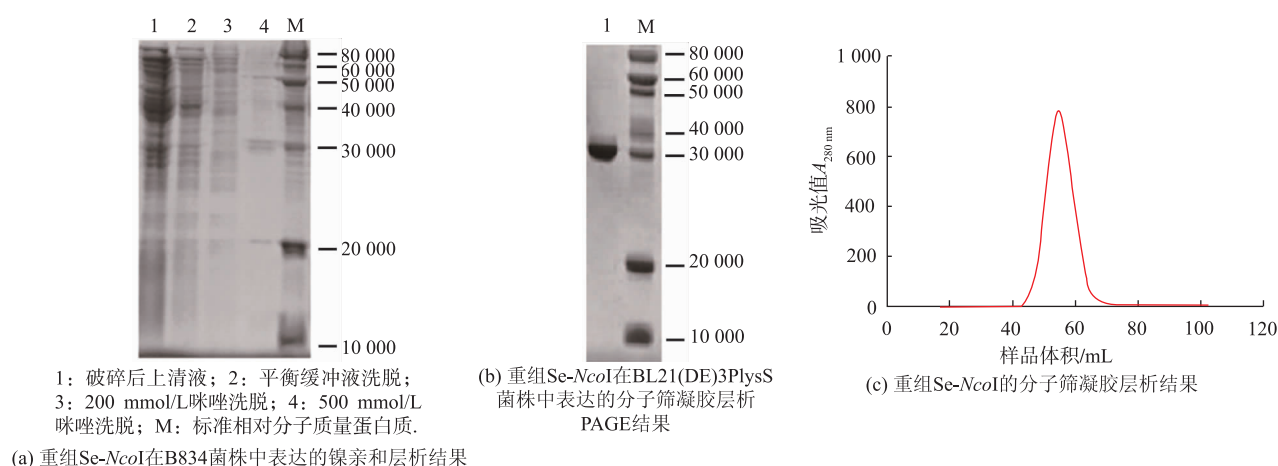


图 3 重组 Se-*NcoI* 的表达与纯化

Fig. 3 Expression and purification of Se-*NcoI*

氨酸的利用存在一定的概率,而且硒代甲硫氨酸对于大肠杆菌具有一定的毒性^[7],然而结果表明 *NcoI* 重组蛋白和 Se-*NcoI* 蛋白酶浓度差别不大,因此需要测定 Se-*NcoI* 蛋白质中硒代甲硫氨酸的取代率。

2.4 重组 *NcoI* 蛋白质及其硒代蛋白的质谱检测

利用飞行质谱实验,对重组 *NcoI* 蛋白和 Se-*NcoI* 蛋白进行相对分子质量测定,从而检测 Se-*NcoI* 蛋白质中甲硫氨酸是否被硒代甲硫氨酸取代。对重组 *NcoI* 蛋白和 Se-*NcoI* 蛋白进行质谱检测,见图 4。将所得数据按照如下公式计算出蛋白质相对分子质量。

$$MV = \frac{(X_1 - 1)(X_2 - 1)}{X_2 - X_1}$$

式中: X_1 与 X_2 为相邻的质荷比,且 $X_2 > X_1$ 。

经计算,重组 *NcoI* 蛋白相对分子质量为 34 510,与 *NcoI* 理论相对分子质量 34 500 相符。重组 Se-*NcoI* 蛋白相对分子质量为 34 744,与 *NcoI* 蛋白质的相对分子质量差为 234。已知硒元素相对原子质量为 78.96,硫元素相对原子质量为 32.065,因此平均每分子 Se-*NcoI* 蛋白质中被硒原子取代的硫原

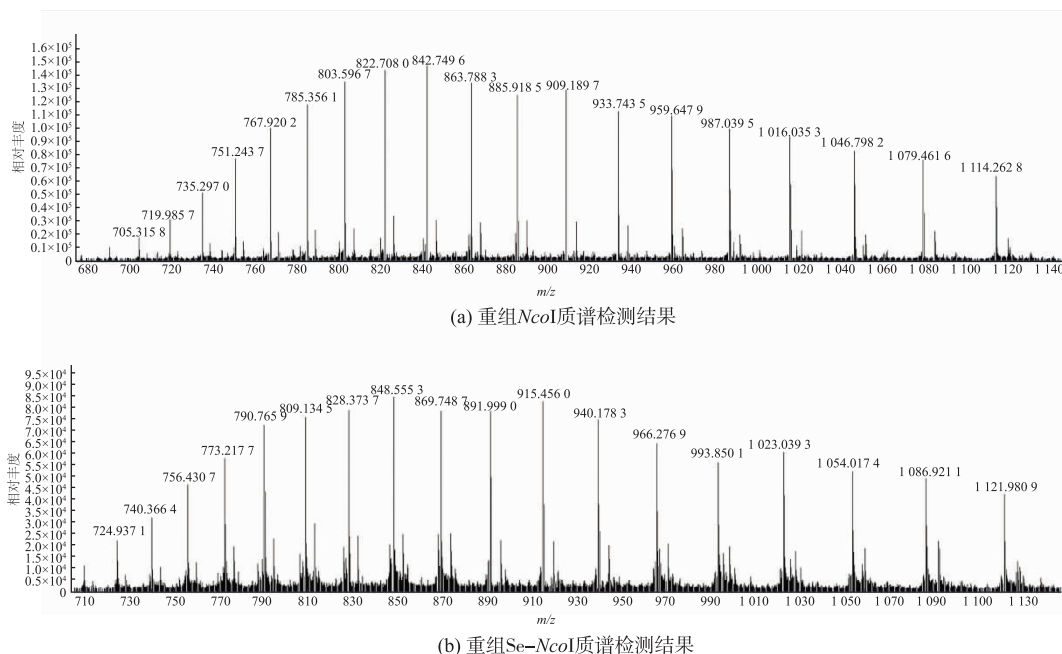
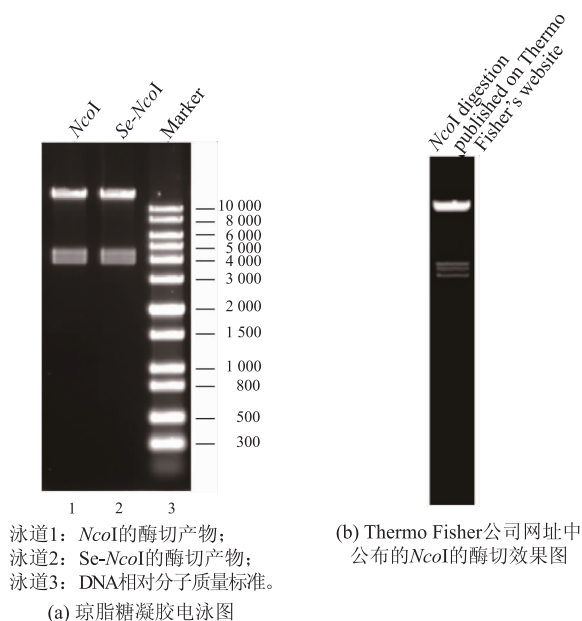
子数量为 $234 / (78.96 - 32.065) = 4.99$ 。由于重组 *NcoI* 蛋白质的氨基酸序列中含有 5 个甲硫氨酸,每个甲硫氨酸残基包含 1 个硫原子,可以推测本批 Se-*NcoI* 蛋白质中的甲硫氨酸已经全部被硒代甲硫氨酸取代,适合进行后续的反常散射实验。

2.5 *NcoI* 蛋白质及其硒代蛋白的酶活检测

在获得重组 *NcoI* 以及 Se-*NcoI* 蛋白质之后,分别对其进行酶活力检测,以验证硒代蛋白是否与野生型蛋白质具有相同的生物学功能。分别用 10 μ g *NcoI* 和 10 μ g Se-*NcoI* 蛋白对 0.3 μ g λ DNA 进行 15 min 快速酶切。琼脂糖凝胶电泳均能显示出明显的特征酶切条带,见图 5(a)。这与 Thermo Fisher 公司网址中公布的 *NcoI* 特征酶切条带相似,见图 5(b),表明被完全硒代的 Se-*NcoI* 蛋白质与野生型蛋白质具有相似的生物学活性,即硒代并不影响 *NcoI* 蛋白质的结构。

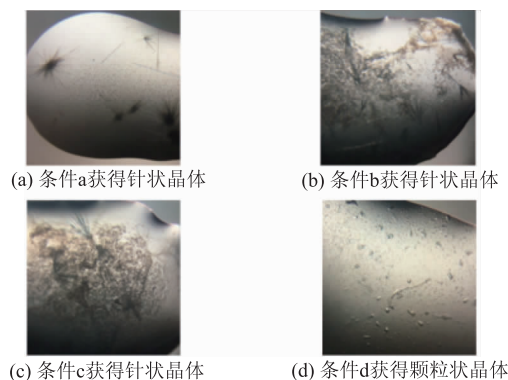
2.6 *NcoI* 蛋白质结晶筛选

将重组 *NcoI* 蛋白和 Se-*NcoI* 蛋白浓缩至 10 mg/mL,在 20 $^{\circ}$ C 下通过坐滴法,采用 10 种蛋白质结晶试剂盒筛选了 528 种结晶生长条件。样品点

图4 *NcoI* 和 Se-*NcoI* 质谱图Fig. 4 Serum mass spectrometry of *NcoI* and Se-*NcoI*图5 *NcoI* 与 Se-*NcoI* 的酶切活力验证Fig. 5 Digestion activity of *NcoI* and Se-*NcoI*

样后观察,*NcoI* 在 4 种条件下形成了初步的晶体。其中条件 a 为 0.1 mol/L 三水合醋酸钠 (pH 4.6)、2.0 mol/L 甲酸钠; 条件 b 为 0.1 mol/L 柠檬酸 (pH 3.5)、25 g/dL PEG 3350; 条件 c 为 0.2 mol/L 硫酸铵、0.1 mol/L BIS-TRIS (pH 6.5)、25 g/dL PEG3350; 条件 d 为 0.8 mol/L 琥珀酸 (pH 7.0)。其中条件 a、b

和 c 下生长出的 *NcoI* 蛋白质晶体呈针状, 见图 6 (a)、(b)、(c), 条件 d 下生长出的蛋白质晶体呈颗粒状, 见图 6(d), 而 Se-*NcoI* 蛋白质在此条件下未形成结晶。

图6 *NcoI* 的结晶条件的筛选Fig. 6 Initial screening of crystallization conditions of *NcoI*

条件 b 和 c 得到的单晶脆弱, 因此无法捞取完整晶体。条件 d 得到的单晶分辨率差, 低于 0.8 nm。条件 a 得到的单晶获得衍射图样见图 7, 晶体存在明显各向异性, 一个方向大约在 0.36 nm, 另一个方向大约在 0.8~1 nm, 需进一步优化。

3 讨论

目前, 限制酶 *NcoI* 在 PDB 蛋白质结构数据库



图 7 重组 *NcoI* X-射线衍射图

Fig. 7 X-ray diffraction image of *NcoI*

里没有找到同源结构,若通过 X-射线晶体衍射的方法解析 *NcoI* 结构,除了需要获得 *NcoI* 的晶体,还需利用 *NcoI* 同源结构、同晶置换或者多波长散射的方法进行 *NcoI* 的结构解析。通过在大肠杆菌中表达硒代甲硫氨酸取代甲硫氨酸的重组蛋白质^[18],结合多波长反常散射(MAD)的方法经过 X 射线衍射可以收集到异常散射原子的边缘及其附近的数据,能够快速准确测定产生的相位角^[19],从而进行 *NcoI* 的结构解析。

限制性内切酶 *NcoI* 对大肠杆菌体内普遍存在的 DNA 甲基化酶基因 *dam* 和 *dcm* 均不敏感,若 BL21(DE3)pLysS 菌株中只表达 *NcoI* 重组蛋白,那么宿主 DNA 会被 *NcoI* 蛋白质严重破坏。而 *NcoI* 对应的甲基化酶 *NcoIM* 基因与限制性内切酶基因共表达,能够使宿主 DNA 获得甲基化保护,从而实现了重组 *NcoI* 的大量表达。

作者发现甲硫氨酸缺陷型菌株 B834 不适宜同时表达 *NcoI* 重组蛋白和 *NcoIM* 重组蛋白。这可能是 B834 菌株中的基因型影响了 *NcoI* 重组蛋白或者 *NcoIM* 重组蛋白的表达。有研究表明,高浓度的异亮氨酸、赖氨酸和苏氨酸能抑制天冬氨酸激酶活性,从而遏制大肠杆菌自身合成甲硫氨酸,且苯丙氨酸在此过程中起到协同作用^[20]。因此,尝试利用同样表达 *NcoI* 重组蛋白的菌株 BL21 (DE3) pLysS-*NcoI*,仅在发酵过程中添加了硒代甲硫氨酸、异亮氨酸等多种氨基酸,期望在抑制大肠杆菌甲硫氨酸本底合成的同时,可以更好地利用外源硒代甲硫氨酸,从而获得硒代 *NcoI*(Se-*NcoI*)蛋白质。经质谱分析发现,硒代蛋白的相对分子质量与未硒代蛋白相差 234,符合硒原子取代 5 个硫原子所增加的相对

分子质量。因此判断 Se-*NcoI* 蛋白质中的 5 个甲硫氨酸全部被硒代甲硫氨酸取代。尽管硒代法适用于大多数原核表达的蛋白质,但是硒代甲硫氨酸容易氧化,并且会取代能够增强蛋白质稳定性的甲硫氨酸,导致硒代蛋白活性降低^[21]。作者对 *NcoI* 及其硒代蛋白进行酶活验证,发现 *NcoI* 及其硒代蛋白都能消化底物 λ DNA,且二者活性类似,从而推测 Se-*NcoI* 与 *NcoI* 蛋白质在结构上类似。作者采用在普通菌株发酵培养基中添加硒代甲硫氨酸及相关氨基酸的实验方案,能够获得完全硒代的 *NcoI* 蛋白质,无需特殊的甲硫氨酸缺陷型表达菌株,这也为获得其他限制性内切酶硒代蛋白表达提供了参考。

X-ray 衍射法需要高质量的蛋白质晶体,而且晶体的生长与否依赖于蛋白质纯度的高低。获得蛋白质结晶的关键步骤是经过蛋白质高效表达以及分离纯化出纯度大于 95%的蛋白质,但是蛋白质结晶条件的初步筛选没有规律,一般需要蛋白质结晶条件筛选试剂盒进行高通量筛选^[22]。作者使用了 10 种蛋白质结晶试剂盒,共计 528 个条件,对 *NcoI* 的蛋白质结晶条件进行了初筛,所得 *NcoI* 晶体衍射的分辨率为 0.8 nm 左右。分辨率低可能是因为蛋白质稳定性较差,或者均一性差。后续将进一步优化 *NcoI* 的蛋白质构建和结晶条件,筛选 *NcoI* 的 DNA 配体,并在此基础上继续进行硒代 Se-*NcoI* 的晶体生长,进一步精细优化条件,以获得能产生良好衍射效果的蛋白质以及蛋白质-DNA 复合物晶体,解析 *NcoI* 的三维结构,以阐明 *NcoI* 特异性识别并切割 DNA 的机制。

4 结 语

作者利用限制性内切酶 *NcoI* 和甲基化酶 *NcoIM* 的大肠杆菌共表达体系,获得了大量表达的限制性内切酶 *NcoI*,其纯度>95%,酶质量浓度为 7.5 mg/mL。同时,通过在基础培养基 M9 中添加高浓度的异亮氨酸、赖氨酸和苏氨酸等,抑制大肠杆菌自身合成甲硫氨酸,提高硒代甲硫氨酸的利用率,获得了重组 *NcoI* 硒代蛋白。另外,*NcoI* 的完全硒代对活性无影响。通过结晶条件初筛得出 *NcoI* 的蛋白质结晶条件,初步获得衍射分辨率为 0.8 nm 的 *NcoI* 晶体,为后续分析结构活性位点、阐明分子机制、进行定向改造、获得高效和无星号活性的突变蛋白质奠定基础。

参考文献:

- [1] GOWERS D M, BELLAMY S R, HALFORD S E. One recognition sequence, seven restriction enzymes, five reaction mechanisms[J]. **Nucleic Acids Research**, 2004, 32(11):3469-3479.
- [2] WEI H, THERRIEN C, BLANCHARD A, et al. The Fidelity Index provides a systematic quantitation of star activity of DNA restriction endonucleases[J]. **Nucleic Acids Research**, 2008, 36(9):e50.
- [3] SHEN B W, HEITER D F, LUNNEN K D, et al. DNA recognition by the *SwaI* restriction endonuclease involves unusual distortion of an 8 base pair A:T-rich target[J]. **Nucleic Acids Research**, 2017, 45:1516-1528.
- [4] BUJNICKI J M. Crystallographic and bioinformatic studies on restriction endonucleases: inference of evolutionary relationships in the "midnight zone" of homology[J]. **Current Protein & Peptide Science**, 2003, 4(5):327-337.
- [5] PINGOUD A, WILSON G G, WENDE W. Type II restriction endonucleases--a historical perspective and more[J]. **Nucleic Acids Research**, 2014, 42(12):7489-7527.
- [6] KAWAMURA T, KOBAYASHI T, WANTANABE N. Analysis of the *HindIII*-catalyzed reaction by time-resolved crystallography[J]. **Acta Crystallographica Section D-Structural Biology**, 2015, 71(2):256-265.
- [7] VAN COTT E M, WILSON G G. Cloning the *FnuDI*, *NaeI*, *NcoI* and *XbaI* restriction-modification systems[J]. **Gene**, 1988, 74(1):55-59.
- [8] DI FELICE F, MICHELI G, CAMILLONI G. Restriction enzymes and their use in molecular biology: an overview[J]. **Journal of Biosciences**, 2019, 44(2):38-46.
- [9] DAUTER Z. Collection of x-ray diffraction data from macromolecular crystals[J]. **Methods in Molecular Biology**, 2017, 1607:165-184.
- [10] MCPHERSON A. Introduction to protein crystallization[J]. **Methods**, 2004, 34(3):254-265.
- [11] HE X, HULL V, THOMAS J A, et al. Expression and purification of a single-chain Type IV restriction enzyme *Eco94GmrSD* and determination of its substrate preference[J]. **Scientific Reports**, 2015, 5:9747.
- [12] MORRIS A L, MACARTHUR M W, HUTCHINSON E G. Stereochemical quality of protein structure coordinates[J]. **Proteins**, 1992, 12(4):345-364.
- [13] BENVENUTIM, MANGANI S. Crystallization of soluble proteins in vapor diffusion for x-ray crystallography[J]. **Nature Protocols**, 2007, 2(7):1633-1651.
- [14] WALSH M A, EVANS G, SANISHVILI R, et al. MAD data collection - current trends[J]. **Acta Crystallographica Section D-Structural Biology**, 1999, 55(10):1726-1732.
- [15] KITAJIMA T, CHIBA Y. Selenomethionine metabolism and its toxicity in yeast[J]. **Biomolecular Concepts**, 2013, 4(6):611-616.
- [16] DAVIES A M, TATA R, AGHA R, et al. Crystal structure of a putative phosphinothricin acetyltransferase (PA4866) from *Pseudomonas aeruginosa* PAC1[J]. **Proteins**, 2005, 61(3):677-679.
- [17] SMITH J L, THOMPSON A. Reactivity of selenomethionine--dents in the magic bullet?[J]. **Structure**, 1998, 6(7):815-819.
- [18] HENDRICKSON W A, HORTON J R, LAMASTER D M. Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction(MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure[J]. **EMBO Journal**, 1990, 9(5):1665-1672.
- [19] CASSETTA A, DEACON A, EALICK S. Development of instrumentation and methods for MAD and structural genomics at the SRS, ESRF, CHESS and Elettra facilities[J]. **Journal of Synchrotron Radiation**, 1999, 6:822-833.
- [20] DOUBLIE S. Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination[J]. **Methods in Enzymol**, 1997, 276:523-530.
- [21] BUDISA N, HUBER R, GOLBIK R, et al. Atomic mutations in annexin V-thermodynamic studies of isomorphous protein variants[J]. **European Journal of Biochemistry**, 1998, 253(1):1-9.
- [22] 陈蕴, 黄鹏飞, 郭瑞庭, 等. 毕赤酵母系统来源的重组人血清白蛋白的制备及初步晶体学分析[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(2):151-157.