

重组人细胞红蛋白的表达纯化及谱学表征

田素燕¹, 李连之¹, 李海丽¹, 薛泽春¹, 杜为红²

(1. 聊城大学化学化工学院, 聊城 252059; 2. 中国人民大学化学系, 北京 100872)

摘要 以可溶性和包涵体两种形式表达纯化得到了重组人细胞红蛋白, 并比较了其谱学特征和热稳定性. 可溶性蛋白经硫酸铵分级沉淀, 再依次经 Hiprep 16/10 Q FF 阴离子交换柱、HiLoad16/60 Superdex 75 凝胶过滤柱和 CM Sepharose FF 阳离子交换柱纯化, 得到电泳纯的包涵体蛋白; 包涵体蛋白经盐酸胍变性溶解、外加血红素重组和柱层析得到了电泳纯的可溶性蛋白. 电喷雾质谱表明, 以这两种形式得到的蛋白分子量相差 153.0, 紫外-可见吸收光谱、荧光光谱和圆二色光谱均表明, 这两种形式的蛋白在血红素构象上存在差异, 其热稳定性也不相同.

关键词 细胞红蛋白; 分离纯化; 谱学表征; 稳定性

中图分类号 O629.73; Q518.2 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2009)03-0483-06

细胞红蛋白(Cytoglobin, Cygb)是 Burmester 等^[1]于 2002 年在小鼠、人和斑马鱼中发现的第四种珠蛋白. 人的细胞红蛋白由 190 个氨基酸组成, 与肌红蛋白有 30% 的序列同源性, 其 N-末端和 C-末端都比肌红蛋白等珠蛋白的序列有所延伸. 但细胞红蛋白具有典型珠蛋白的氨基酸序列特征, 如关键氨基酸残基 Phe(CD1), His(E7)和 His(F8). 晶体结构测定表明, 它具有典型珠蛋白的折叠结构, 与神经红蛋白(Ngb)相似, 也是一个六配位结构的血红素蛋白^[2]. 与典型珠蛋白不同的是, 细胞红蛋白的血红素附近有一个较大的非极性蛋白基质空腔, 它与外部相连并可能提供一个特殊的“配体通道”路径^[3,4]. 细胞红蛋白几乎在人体各类组织中都有表达, 关于它的生物学功能目前仍不确定. 已有研究表明, 细胞红蛋白可能起到气感受器的作用, 具有携氧和储氧、一氧化氮解毒、生物酶和神经保护等功能. 此外, 它可能与胶原的形成有关^[5].

目前, 细胞红蛋白的研究受到广泛关注, 但对其基本化学生物学性质的研究还远远不够, 而且其具体的生物学功能尚不明确. 在已有的文献^[3,4,6-10]报道中, 细胞红蛋白的制备几乎都是以包涵体形式表达得到的, 该过程需将包涵体变性溶解、外加血红素重组等, 以这种方法得到的蛋白可能与以可溶性形式表达纯化得到的蛋白在性质和功能上有所不同. 本文制备了以可溶性形式表达的细胞红蛋白(Scygb)和以包涵体形式表达的细胞红蛋白(Icygb), 对比研究了这两种形式的蛋白的一些基本性质, 为进一步系统研究该蛋白的化学生物学性质提供了信息.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

带有人细胞红蛋白基因的 pET3a 质粒由德国 Johannes Gutenberg University of Mainz 大学 Frank Gerlach 教授惠赠. *E. coli* BL21(DE3) pLys 为本实验室保存, 酵母提取物和胰化蛋白胨(Oxoid Ltd., England), 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG, Sigma), 巯基乙醇(Sigma), 氯化血红素(MP Biomedicals LLC, Germany), 其它试剂均为国产分析纯或生化试剂.

AKTA Purifier 100 快速蛋白纯化系统(Amersham Biosciences, Sweden), Q-Star XL 电喷雾质谱仪(ABI), Jasco J-810 圆二色谱仪(日本分光公司), HP8453 型紫外-可见阵列二极管分光光度计(美国惠普公司), LS55 型荧光分光光度计(Perkin Elmer, USA), Hitachi CR22G 高速冷冻离心机(日本日立公

收稿日期: 2008-07-21.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20471025)资助.

联系人简介: 李连之, 男, 博士, 教授, 主要从事生物无机化学研究. E-mail: lilianzhi1963@163.com

司), DYY-5 稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂).

1.2 细胞红蛋白的基因表达

将带有人细胞红蛋白基因 pET3a 质粒按常规分子生物学方法^[11]转化至 *E. coli* BL21 (DE3) plys 中, 在含氨苄青霉素和氯霉素的 LB 固体培养基上进行培养, 筛选含有该基因的单菌落. 选取单菌落接种于小量 TB 液体培养基, 于 180 r/min、310 K 培养 12 h 后, 按体积分数 1% 转入另一个含大量 TB 液体的培养基中, 于 180 r/min、298 K 培养至 $A_{550\text{ nm}} = 1.2$, 然后加入 IPTG 至终浓度为 0.04 mmol/L, 诱导表达 12 h, 收集菌体, 并用 pH = 7.5 的 50 mmol/L Tris-HCl 洗涤.

1.3 细胞红蛋白的分离纯化

将湿菌体按 1:2 体积比悬浮于细胞裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH = 7.5, 0.5 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF) 中, 然后超声破碎至完全裂解, 以 15000 r/min 的转速于 277 K 下离心 30 min, 得到暗红色上清液和灰色沉淀 (主要含有以包涵体形式存在的目的蛋白), 分别处理.

暗红色上清液经 30% 和 80% 硫酸铵分级沉淀, 然后依次上 Hiprep 16/10 Q FF 阴离子交换柱、Hi-load 16/60 Superdex 75 凝胶过滤柱、CM Sepharose Fast Flow 阳离子交换柱和 Hiload 16/60 Superdex 75 凝胶过滤柱进行纯化, 得到电泳纯的蛋白. 其中, 阴离子交换柱用 20 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.5) 平衡, 用 0~1 mol/L NaCl 缓冲液进行线性梯度洗脱; 凝胶过滤柱用 0.1 mol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH = 8.0) 平衡; 阳离子交换柱用 20 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠 (pH = 5.5) 平衡, 用 0~1 mol/L NaCl 缓冲液进行线性梯度洗脱. 将纯化后的蛋白用二次水充分透析, 冷冻干燥, 于 253 K 保存.

灰色沉淀按文献[6]方法处理并加以改进, 用包涵体洗涤液 (1% TritonX-100, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-HCl, pH = 7.5) 洗涤 4 次后溶解于包涵体溶解液 (6 mol/L 盐酸胍, 1% β -巯基乙醇, 50 mmol/L Tris-HCl, pH = 7.5) 中. 离心后, 取适量血红素加入到上清液中, 透析 4 次. 再离心后保留清液, 依次通过 Hiprep 16/10 Q FF 阴离子交换柱和 Hiload16/60 Superdex 75 凝胶过滤柱进行纯化, 得到电泳纯的蛋白. 将纯化后的蛋白用二次水充分透析, 冷冻干燥, 于 253 K 保存.

SDS-PAGE 凝胶电泳采用文献[11]方法, 电泳后用 0.25% 考马斯亮蓝 R-250 染色.

1.4 细胞红蛋白的谱学表征

电喷雾质谱 (ESI-MS) 由复旦大学生物医学研究院测定. 将两种干燥后的纯蛋白分别溶解于 100 mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH = 7.0) 缓冲液中, 配制成为 0.5 mmol/L 的母液.

1.4.1 UV-Vis 吸收光谱测量 取适量母液于 100 mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH = 7.0) 缓冲液中, 蛋白终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$; 在氧化态蛋白溶液中加入少许连二亚硫酸钠得到还原态蛋白.

1.4.2 荧光光谱测量 蛋白浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$, 激发和发射的狭缝宽度分别为 10 nm 和 5 nm. 测量激发光谱时固定发射波长为 340 nm, 扫描范围为 240~320 nm. 测量发射光谱时固定激发波长为 280 nm, 扫描范围为 300~400 nm.

1.4.3 圆二色光谱测量 光源系统用 N_2 气保护 (流量为 5 L/min), 190~250 nm 扫描时使用 0.1 cm 样品池, 蛋白浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$; 250~600 nm 扫描时使用 1.0 cm 样品池, 蛋白浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$, 测量参数: 扫描速率 100 nm/min, 分辨率 0.2 nm, 响应时间 0.25 s, 累积次数 3 次.

1.5 细胞红蛋白的热稳定性

取适量母液于 100 mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH = 7.0) 缓冲液中, 使蛋白终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$, 测定不同温度 (298~368 K) 下的 UV-Vis 吸收光谱. 溶液上面覆盖一层石蜡油以防在较高温度下蒸发, 每个温度下平衡 15 min 后测量.

2 结果与讨论

2.1 细胞红蛋白的基因表达与分离纯化

将带有人细胞红蛋白基因 pET3a 质粒转化至 *E. coli* BL21 (DE3) plys 后, 筛选阳性克隆进行测序鉴定, 结果表明序列正确. 细胞红蛋白基因由 570 bp 核苷酸组成, 编码 190 个氨基酸.

细胞红蛋白在 *E. coli* BL21 (DE3) plys 中表达时, 湿菌体的颜色与诱导时的细菌浓度有较大关系, 当 $A_{550\text{ nm}} = 0.8 \sim 1.0$ 时诱导, 可收集到 5 g/L 的暗红色湿菌体, 该种湿菌体中所表达的细胞红蛋白为可溶性的; 当 $A_{550\text{ nm}} > 1.0$ 时诱导, 可收集到 7 g/L 的墨绿色湿菌体, 该种湿菌体所表达的细胞红蛋白则包括可溶性和包涵体两种形式, 纯化后得到这两种形式的蛋白质量比约为 2: 1, 即每 7 g 湿菌体可得 7 mg 的 Scygb 和 3 mg 的 Icygb.

通过 SDS-PAGE 凝胶电泳可以看出, 这两种形式的蛋白都达到了电泳级纯度(图 1).

2.2 细胞红蛋白的谱学表征

电喷雾质谱显示 Scygb 的分子量为 21403.8 [图 2(A)], Icygb 的分子量则为 21556.8 [图 2(B)], 两者相差 153.0, 可以看出 Scygb 的分子量更接近于理论分子量(21404.6). 这是由于在溶解包涵体的过程中使用了 β -巯基乙醇, 使细胞红蛋白分子中两个 Cys 残基分别与 β -巯基乙醇反应, 而各自连接上一个巯基乙醇基团, 因此其分子量增加 153.0, 这与 Hamdane 等^[8]的研究结果一致.

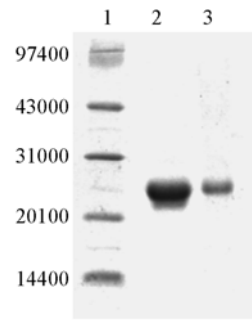


Fig. 1 SDS-PAGE pattern of purified Cygb
Lane 1: molecular weight markers; lane 2: Scygb; lane 3: Icygb.

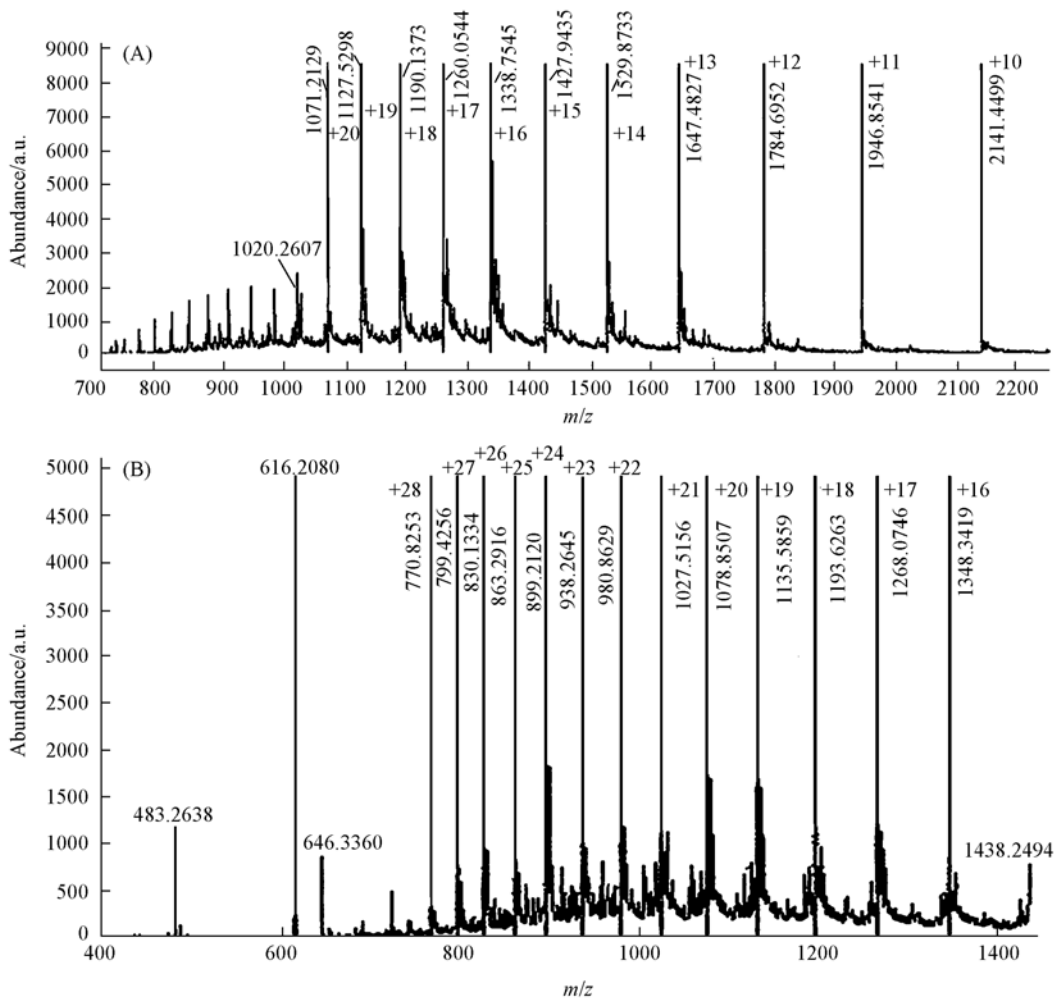


Fig. 2 Electrospray ionization mass spectra of 5 $\mu\text{mol/L}$ Scygb (A) and Icygb (B)

图 3 为细胞红蛋白在 100 mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH = 7.0) 缓冲液中的 UV-Vis 吸收光谱. 通过对比可以看出, Scygb 和 Icygb 的氧化态和还原态的吸收峰位一致, 但 $A_{428\text{ nm}}$ (R) 与 $A_{416\text{ nm}}$ (O) 峰值比

有所差别, Scygb 的 $A_{428\text{ nm}}(\text{R})/A_{416\text{ nm}}(\text{O})$ 为 1.39, 而 Icygb 的 $A_{428\text{ nm}}(\text{R})/A_{416\text{ nm}}(\text{O})$ 为 1.48. 氧化态的细胞红蛋白在 416 nm 处有强的吸收峰, 它对应于金属卟啉的 γ 吸收带, 是电子在卟啉环中非定域化 π 电子的轨道跃迁 ($\pi \rightarrow \pi^*$) 的结果^[12], 500 ~ 600 nm 间有宽的弱吸收. 还原态的细胞红蛋白在 428, 531 和 561 nm 有吸收峰, 分别对应于金属卟啉的 γ , β 和 α 吸收带, 这与神经红蛋白的 UV-Vis 吸收光谱相似^[13,14].

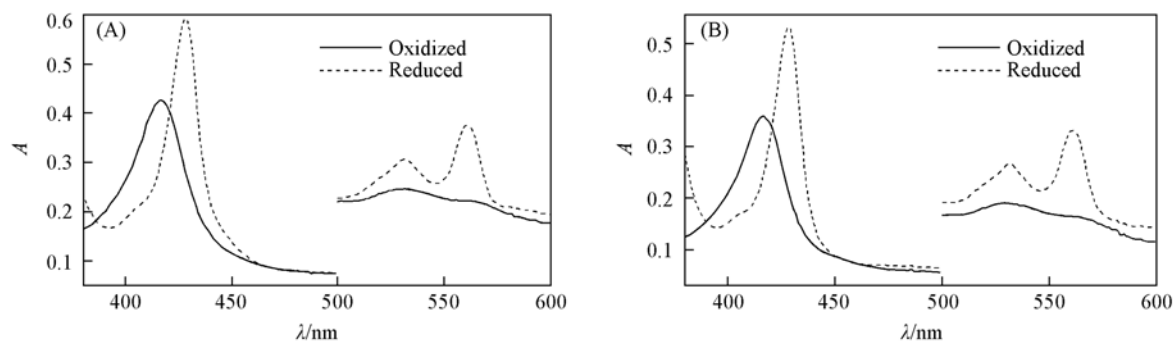


Fig. 3 UV-Vis spectra of Scygb (A) and Icygb (B)

图 4 为细胞红蛋白在 100 mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH = 7.0) 缓冲液中的荧光光谱. Scygb 和 Icygb 两者激发光谱与发射光谱的最大吸收峰的位置一样, 激发光谱的最大波长为 280 nm, 发射光谱最大波长为 340 nm. 但相同浓度下 Scygb 的荧光强度要比 Icygb 高一倍左右, 这可能是由于两种形式下的蛋白分子构象存在差别所致. 细胞红蛋白的荧光光谱主要是由其中含有的色氨酸 (Trp) 和酪氨酸 (Tyr) 残基产生的, 在细胞红蛋白中含有 3 个 Trp 和 5 个 Tyr 荧光残基.

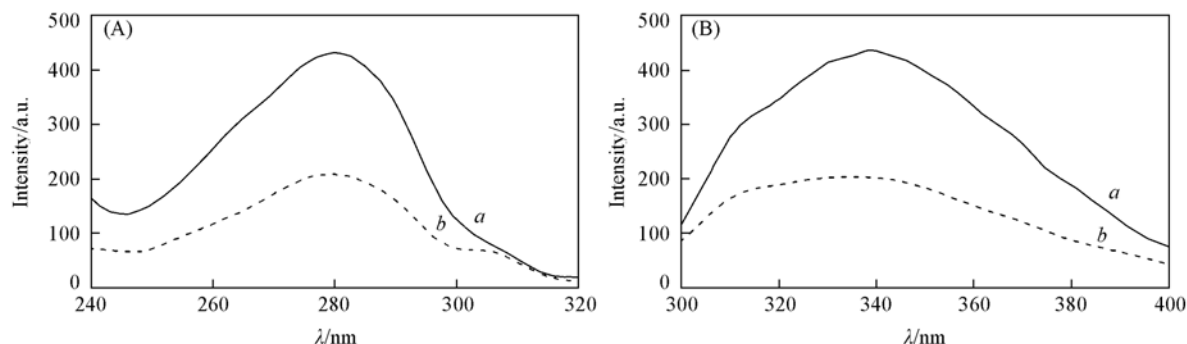


Fig. 4 Fluorescence excitation (A) and emission (B) spectra of 5 $\mu\text{mol/L}$ Scygb (a) and Icygb (b)

图 5 为细胞红蛋白在 100 mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH = 7.0) 缓冲液中远紫外区 (190 ~ 250 nm) 的圆二色光谱图. 由图 5 可以看出, Scygb 和 Icygb 的谱型相同, 在 221 nm 处有一负峰, 209 nm 处有一肩峰, 在 193 nm 处有一正峰, 为典型的 α -螺旋结构. 用 Jasco J-810 圆二色谱仪附带的杨氏计算法得到 Scygb 和 Icygb 的 α -螺旋相对含量分别为 64.4% 和 62.0%.

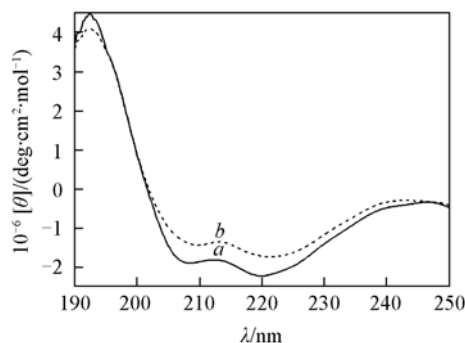


Fig. 5 CD spectra of 1 $\mu\text{mol/L}$ Scygb (a) and Icygb (b)

图 6 为细胞红蛋白在近紫外区 (250 ~ 350 nm) 和可见光区 (350 ~ 600 nm) 的圆二色谱. 由图 6 可以看出, Scygb 和 Icygb 的还原态均在 424 和 555 nm 处有正峰, 氧化态均在 257 和 412 nm 处有正峰, 在 285 nm 处有负峰. 但与 Icygb 相比, Scygb 的还原态在 425 nm 处呈现一负峰, 氧化态在 453 nm 处呈现一负峰, 这可能是由于这两种形式蛋白的血红素的构象不同或所处的环境不同所致. 血红素类蛋白的铁卟啉光谱吸收的大多数谱带可归属为特殊的电子跃迁, 4 个极化的平面 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁被指认为 Q 带 (470 ~ 600 nm)、B 带 (380 ~ 450 nm)、N 带 (300 ~ 350 nm) 和 L 带 (250 ~ 300 nm). 每条谱带对应于一

种电子振动结构, 这归因于电子与适当对称的振动模式的偶合^[15]. 所有的跃迁对 CD 谱都有显著的贡献, 对左右圆偏振光有不同的吸收.

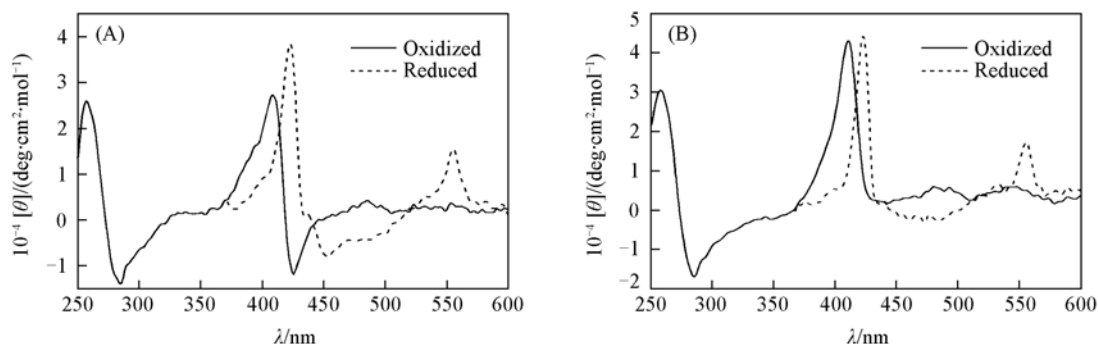


Fig. 6 CD spectra of 5 $\mu\text{mol/L}$ Scygb (A) and Icygb (B)

2.3 细胞红蛋白的热稳定性研究

细胞红蛋白与神经红蛋白相似, 有较高的热稳定性, Hamdane^[9]等利用圆二色谱研究得出其融解温度(T_m)为 368 K. 图 7 中(A)和(B)为细胞红蛋白在 100 mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH = 7.0) 缓冲液中不同温度下的紫外-可见吸收光谱, 图 7(C)为 416 nm 处吸光度随温度变化的归一化曲线. 通过对比, Scygb 在 416 nm 处的吸光度随着温度的升高逐渐降低, Icygb 则反而在 358 K 之前有所上升, 温度再升高后迅速下降. 两者不同的原因可能在于, 以包涵体形式纯化出的蛋白, 因为两个 Cys 残基各联上一个巯基乙醇基团, 形成新的氢键网络而使血红素的环境改变, 致使血红素不易从蛋白肽链上解离下来, 这与紫外可见吸收光谱、荧光光谱和圆二色光谱的实验结果一致.

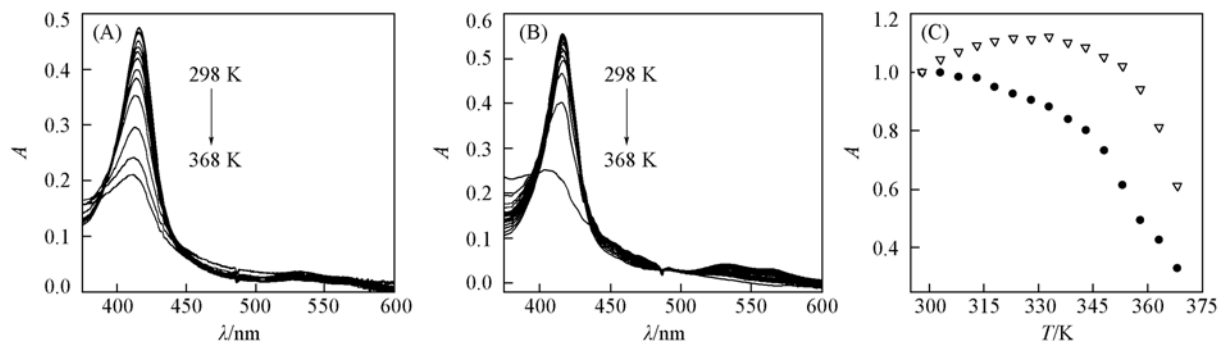


Fig. 7 UV-Vis spectra of 5 $\mu\text{mol/L}$ Scygb (A) and 5 $\mu\text{mol/L}$ Icygb (B) in thermal denaturation process and the normalized absorbance of Scygb (●) and Icygb (▽) at 416 nm at different temperatures (C)

3 结 论

以可溶性和包涵体两种形式表达纯化得到了重组人细胞红蛋白, 通过电喷雾质谱、紫外-可见吸收光谱、荧光光谱和圆二色光谱对其进行了比较. 结果表明, 这两种形式的蛋白在分子构象上存在着差异, 以可溶性形式纯化出的蛋白更接近于天然存在的形式, 这为进一步详细研究细胞红蛋白的化学生物学性质提供了信息.

感谢德国 Johannes Gutenberg University of Mainz 大学 Frank Gerlach 教授惠赠细胞红蛋白基因.

参 考 文 献

- [1] Burmester T., Ebner B., Weich B., *et al.*. Mol. Biol. Evol. [J], 2002, **19**(4): 416—421
- [2] Hankeln T., Ebner B., Fuchs C., *et al.*. J. Inor. Biochem. [J], 2005, **99**: 110—119
- [3] De Sanctis D., Dewilde S., Pesce A., *et al.*. Biochem. Biophys. Res. Commun. [J], 2004, **316**: 1217—1221
- [4] De Sanctis D., Dewilde S., Pesce A., *et al.*. J. Mol. Biol. [J], 2004, **336**: 917—927
- [5] KUANG Su-Hua (邝素华). J. Int. Pathol. Clin. Med. (国际病理科学与临床杂志) [J], 2005, **25**(6): 559—562

- [6] De Sanctis D. , Dewilde S. , Pesce A. , *et al.* . Acta. Cryst. D[J] , 2003 , **59** : 1285—1287
- [7] Sugimoto H. , Makino M. , Sawai H. , *et al.* . J. Mol. Biol. [J] , 2004 , **339** : 873—885
- [8] Hamdane D. , Kiger L. , Dewilde S. , *et al.* . J. Mol. Biol. [J] , 2003 , **278**(51) : 51713—51721
- [9] Hamdane D. , Kiger L. , Dewilde S. , *et al.* . FEBS. J. [J] , 2005 , **272**(8) : 2076—2084
- [10] Fago A. , Hundahl C. , Dewilde S. , *et al.* . J. Biol. Chem. [J] , 2004 , **279**(43) : 44417—44426
- [11] Sambrook J. , Fritsch E. F. , Maniatis T. . Molecular Clone; A Laboratory Manual, 2nd Ed. [M] , New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 16—34
- [12] WANG Kui(王夔). Bioinorganic Chemistry(生物无机化学)[M] , Beijing: Tsinghua University Press, 1998: 120—121
- [13] LI Lian-Zhi(李连之), JI Hai-Wei(冀海伟), ZHAO Chao(赵超) , *et al.* . Chinese Science Bulletin(科学通报)[J] , 2005 , **50** : 964—969
- [14] ZHAO Chao(赵超), LI Lian-Zhi(李连之), JI Hai-Wei(冀海伟) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J] , 2006 , **27**(4) : 641—645
- [15] Eaton W. A. , Hofrichter J. . Meth. Enzymol. [J] , 1981 , **76** (1) : 175—226

Expression, Purification and Spectral Characterization of Recombinant Human Cytoglobin

TIAN Su-Yan¹, LI Lian-Zhi^{1*}, LI Hai-Li¹, XUE Ze-Chun¹, DU Wei-Hong²

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China;

2. Department of Chemistry, Renmin University of China, Beijing 100872, China)

Abstract Cytoglobin(Cygb) is a recently discovered hemeprotein belonging to the globin superfamily together with hemoglobin, myoglobin and neuroglobin. It is distributed in almost all human tissues. Human cytoglobin is composed of 190 amino acid residues, displays a hexacoordination His-Fe-His in the absence of external ligands. In almost all the published literatures, Cygb was expressed in inclusion bodies and purified from this form. Herein, we expressed and purified recombinant human Cygb in soluble form and in inclusion bodies form, and comparely studied their spectral features and thermal stability. The soluble form protein was purified by ammonium sulfate precipitation, Hiprep 16/10 Q FF anion exchange column, Hiload 16/60 superdex 75 size exclusion chromatography and CM Sepharose Fast Flow cation exchange column. The inclusion bodies form protein was purified by dissolving in 6 mol/L guanidinium chloride, renatured with haemin solution and chromatography. ESI-MS results indicate that the molecular weight of the two forms of Cygb is difference with 153.0. The UV-Vis absorption spectra, fluorescence spectra and circular dichroism spectra show that the heme conformations in the two form cytoglobin proteins are different, and there exists difference between the two forms in their thermal stability.

Keywords Cytoglobin; Separation and purification; Spectral characterization; Stability

(Ed. : M, G)