

泡桐丛枝植原体胸苷酸激酶的原核表达、 纯化及酶活性测定

宋传生¹, 胡佳续², 林彩丽¹, 任争光¹, 耿显胜³, 田国忠^{1*}

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 100091;
2. 天津出入境检验检疫局, 天津 300457; 3. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要:胸苷酸激酶是 dTTP 从头合成和补救途径的关键酶, 催化 dTMP 形成 dTDP, 在 DNA 复制和生物的生存中发挥着必不可少的作用。本文在前期研究的基础上, 对从泡桐丛枝 (PaWB) 植原体中获得的 3 个同源蛋白 TMK-a-1、TMK-a-2 及 TMK-b 与已报道的小麦蓝矮 (WBD)、洋葱黄化 (OY-W) 植原体的 TMK-a、TMK-b 的氨基酸序列进行了比对和相似性分析, 结果显示 PaWBPS TMK-b 与 WBD TMK-2 和 OY-W TMK-b 之间的相似性分别为 95.65% 和 99.03%; PaWBPS TMK-a-1 与 PaWBPS TMK-a-2 的相似性为 90.57%, 且二者与 WBD TMK-1 和 OY-W TMK-a 之间的相似性为 87.32% - 94.26%; 而 PaWBPS、WBD、OY-W 三种植原体的 TMK-a 与 TMK-b 之间的相似性仅为 22.22% - 25.95%。构建了 PaWBPS TMK-b、TMK-a-1、TMK-a-2 的 pET28a 原核表达载体, 对 PaWBPS TMK-b、TMK-a-1、TMK-a-2 3 种蛋白进行了原核表达, 经 Ni-NTA 柱纯化后, 利用双酶法进行了胸苷酸激酶催化活性测定, 结果表明, PaWBPS TMK-b 具有较高的胸苷酸激酶活性, 为 $85.96 \pm 0.74 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 而 PaWBPS TMK-a-1 和 TMK-a-2 几乎没有胸苷酸激酶活性。本文为进一步研究胸苷酸激酶在植原体繁殖过程中的作用机理奠定了基础。

关键词:泡桐丛枝植原体; 胸苷酸激酶; 原核表达; 酶活性

中图分类号: S792.43

文献标识码: A

Prokaryotic Expression, Purification and Enzyme Activity Assay of Thymidylate Kinase of the *Paulownia* Witches' -broom Phytoplasma

SONG Chuan-sheng¹, HU Jia-xu², LIN Cai-li¹, REN Zheng-guang¹, GENG Xian-sheng³, TIAN Guo-zhong¹

(1. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Forest Protection, State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 2. Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300457, China; 3. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: Thymidylate kinase catalyses the phosphorylation of dTMP to form dTDP in both the *de novo* and salvage pathways of dTTP synthesis, and it is crucial for DNA replication and life survival. In previous study, the *tmk-a-1*, *tmk-a-2* and *tmk-b* genes of *Paulownia* witches' -broom Pingshan strain (PaWBPS) were obtained. On the basis of previous study, the amino acid sequence alignment and similarity analysis were conducted among PaWBPS TMK-a-1, PaWBPS TMK-a-2, PaWBPS TMK-b, onion yellow wild-type line (OY-W) TMK-a, OY-W TMK-b, white blue dwarf (WBD) TMK-a and WBD TMK-b. The amino acid sequence similarity value was 96.65% between PaWBPS TMK-b and WBD TMK-2, 99.03% between PaWBPS TMK-b and OY-W TMK-b, 90.57% between PaWBPS

收稿日期: 2014-03-11

基金项目: 国家自然科学基金(30872025 和 31170602)

作者简介: 宋传生(1984—), 男, 在读博士研究生, 研究方向为分子植物病理。E-mail: scssy@163.com

* 通讯作者: 博士, 研究员。E-mail: tiangz@caf.ac.cn

TMK-a-1 and PaWBPS TMK-a-2, ranged from 87.32% to 99.26% among PaWBPS TMK-a-1, PaWBPS TMK-a-2, WBD TMK-1 and OY-W TMK-a, and from 22.22% to 25.95% among TMK-a and TMK-b of PaWBPS, OY-W and WBD phytoplasma. The pET28a system was used to generate a polyhistidine (polyHis)-tagged TMK fusion protein. The polyHis-tagged TMKs were expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cell and purified under native conditions by Ni-NTA chelating column. Then, the TMK activity was measured using enzyme-coupled assay. Results suggested that the TMK-b had thymidylate kinase activity ($85.96 \pm 0.74 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$) and the TMK-a-1 and TMK-a-2 had hardly any activity.

Key words: *Paulownia witches' broom* phytoplasma; thymidylate kinase; prokaryotic expression; enzyme activity

泡桐 (*Paulownia* spp.) 为玄参科泡桐属木本植物, 在中国分布广泛, 分布于北起辽宁南部、北京一线, 南至广东、广西, 东起台湾, 西至云南、贵州、四川等省的广大范围内。其木材因纹理通直、结构均匀、不易变形、声学性好、容易加工等特点, 成为家具、建筑、乐器等的重要用材; 其根、果实因性味苦寒可入中药。然而, 在北至山海关、南至长江流域的广大范围内, 由泡桐丛枝植原体引起的泡桐丛枝病给泡桐的生产带来了重大危害^[1]。植原体隶属柔膜菌纲, 不具细胞壁、极难体外培养, 专性寄生于寄主植物韧皮部的筛管及介体昆虫的唾液腺、血淋巴、肠道等组织细胞内, 能够引起植物丛枝、矮化、黄化、花变绿及花变叶等症状, 是一类重要的林木病原, 具有重要的学术研究价值。

胸苷酸激酶 (thymidylate kinase, TMP kinase or TMK; EC 2.7.4.9) 存在于人类 (*Homo sapiens*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、痘病毒 (*Vaccinia virus*)、天花病毒 (*Variola virus*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 等几乎所有生物中, 可催化磷酸基从 ATP 转移到 dTMP 形成 dTDP, 是 dTTP 从头合成和补救途径的关键酶, 在 DNA 复制和生物的生长中发挥着必不可少的作用^[2-3]。如, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中, 胸苷酸激酶对合子的第一次分裂及早期种子的萌发具有重要作用^[4]。在细胞中, 胸苷酸激酶的表达受细胞周期转变的调控^[4-6]。鉴于 TMK 对生物的生长必不可少, 在医学上, TMK 成为疾病治疗的药物靶标^[7-9]。

2000年, 江施幸对丝瓜簇叶植原体胸苷酸激酶的原核表达及酶动力学研究^[10]。随后, Miyata 首次从洋葱黄化植原体中克隆测序了胸苷酸激酶基因 (*tmk*), 并对胸苷酸激酶进行了原核表达及体外酶活性的测定, 发现 TMK-b 具有较高的酶活性而 TMK-a 体外无酶活性^[11]。李蓓在小麦蓝矮植原体 TMK 的

研究中获得了和 Miyata 相似的结果^[12]。到目前为止, 除上述研究外, 未有更多关于植原体 TMK 功能研究的相关报导。

本实验室前期研究发现, 相比于洋葱黄化、翠菊黄化丛枝、小麦蓝矮、苹果丛簇等植原体^[10-14], 泡桐丛枝植原体 (河北平山株系和江西吉安株系) 基因组中含有更加丰富的 *tmk-a* 基因多态性; 和其他植原体相同的是, 泡桐丛枝植原体 *tmk-b* 基因序列单一^[15]。本文在前期研究的基础上, 对泡桐丛枝植原体 *tmk-a* 的优势序列 *tmk-a-1* (PaWBPs *tmk-a* clone 5, Genbank 登录号为: KJ452495)、*tmk-a-2* (PaWBPs *tmk-a* clone 1, GenBank 登录号为: KJ452492) 以及 *tmk-b* (GenBank 登录号为: KJ452545) 编码蛋白氨基酸的序列进行了比对分析, 发现与已报道的 WBD 和 OY-W TMK 既有相似的结构, 又有明显的差异和特征区域; 为了阐明和比较这些基因的结构与功能, 我们对这三个能编码完整蛋白的基因都进行了原核表达载体的构建、原核表达、蛋白纯化, 对纯化的蛋白 TMK-a-1、TMK-a-2、TMK-b 进行了体外酶活性测定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株和质粒 泡桐丛枝植原体菌株采自河北平山, 保存在发病的泡桐组织培养苗上, 并表现典型丛枝症状^[16]。*E. coli* DH5 α 感受态细胞 (天根公司) 用于质粒的转化与克隆; *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞 (天根公司) 用于蛋白的原核表达; 分别连接有 *tmk-a-1*、*tmk-a-2*、*tmk-b* 基因的 pMD18-T 质粒作为 PCR 扩增模板。

1.1.2 主要试剂 $2 \times \text{Taq Mix}$ 、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA Marker 均购买自天根生物科技公司; 低分子量蛋白 Marker II (PP2001)、蓝色预染 Marker (PP2301)、碱性磷酸酶底物显色试剂

盒 (BCIP/NBT) 均购买自北京博迈德科技发展有限公司; $6 \times \text{His}$ 单克隆抗体购自上海生工生物工程股份有限公司; pMD18-T 载体购自 Takara 公司; QIAGEN Ni-NTA Fast Start Kit (30600) 购自上海凯杰生物技术有限公司; 其它化学试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增及序列测定 PCR 反应体系: 25 μL 反应体系中含有 $2 \times \text{Taq Mix}$ 12.5 μL , DNA 1 μL , 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正反向引物各 0.5 μL , ddH_2O 10.5 μL 。

PCR 反应条件: 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 30 s, 55°C (*tmk-a-1*, *tmk-a-2*, *tmk-b*) 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 35 个循环; 72°C 10 min; 4°C 保温。

所有引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

序列测定由北京华大基因研究中心、上海吉美生物医药科技有限公司完成。

1.2.2 序列分析 利用 DNAMAN 进行序列的拼接、比对及序列相似值的计算。

1.2.3 原核表达载体的构建、蛋白的诱导表达及纯

化 设计含有 *Nco* I 和 *Xho* I 限制性酶切位点的正反向引物 PaWBtmkaF-*Nco* I 和 PaWBtmkaR-*Xho* I (表 1), 从连接有 *tmk-a-1* 和 *tmk-a-2* 基因的 pMD18-T 载体上 PCR 扩增 *tmk-a-1* 和 *tmk-a-2* 片段; 设计含有 *Nco* I 和 *Xho* I 限制性酶切位点的正反向引物 PaWBtmkbF-*Nco* I 和 PaWBtmkbR-*Xho* I (表 1), 从连接有 *tmk-b* 基因的 pMD18-T 载体中 PCR 扩增 *tmk-b* 片段。将 PCR 扩增的 *tmk-a-1*、*tmk-a-2* 和 *tmk-b* 片段切胶纯化回收。pET28a 载体和回收的 *tmk-a-1*、*tmk-a-2*、*tmk-b* 片段经 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切后切胶纯化回收, 然后将 *tmk-a-1*、*tmk-a-2* 及 *tmk-b* 与 pET28a 经 T4 连接酶连接。将连接产物转化到 BL21 (DE3) 感受态大肠杆菌中, 在含有 Kan 抗生素的 LB 固体培养基上培养, 挑取单菌落摇菌后提取质粒, 通过 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定连接是否成功, 将连接成功的载体测序验证。由于在设计反向引物 PaWBtmkaR-*Xho* I 和 PaWBtmkbR-*Xho* I 时去掉了 *tmk-a-1*、*tmk-a-2* 及 *tmk-b* 基因的终止密码子, 因此表达的 TMK-a-1、TMK-a-2 及 TMK-b 能和 $6 \times \text{His}$ 标签形成融合蛋白。

表 1 本研究所用引物表

引物名称	引物序列	退火温度	延伸时间
PaWBtmkaF- <i>Nco</i> I	5' -CATGCCATGGGCATGAAATTAATCGTTTTTGAAGG-3'	55°C	45 s
PaWBtmkaR- <i>Xho</i> I	5' -CCGCTCGAGTTATGATCGCCATTGATAGT-3'		
PaWBtmkbF- <i>Nco</i> I	5' -CATGCCATGGGCATGTTTATTTCTTTTGAAGG-3'	55°C	45 s
PaWBtmkbR- <i>Xho</i> I	5' -CCGCTCGAGTAATTTCTATTTGAAAGACTTC-3'		

37°C 活化含有 *tmk-a-1*、*tmk-a-2*、*tmk-b* 基因的 BL21 (DE3) 菌株, 加入 IPTG 至终浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 28°C 诱导 *tmk-a-1*、*tmk-a-2*、*tmk-b* 基因的表达, 6 h 后收集菌体。TMK-a-1、TMK-a-2、TMK-b 蛋白的纯化参照 QIAGEN Ni-NTA Fast Start Kit (30600) 产品说明书进行, 收集菌体后加入菌体裂解缓冲液冰浴 30 min, 4°C 14 000 g 离心 40 min, 在重力作用下将上清液流过 Ni-NTA 柱, 用冲洗缓冲液冲洗两次, 最后用洗脱缓冲液洗脱蛋白, 用 Nanodrop 1 000 核酸/蛋白微量测定仪 (Thermo 公司) 测定蛋白浓度 (以蛋白洗脱液做空白对照)。

1.2.4 TMK 蛋白的酶催化活性测定 采用双酶分析法对纯化的 TMK-a-1、TMK-a-2、TMK-b 蛋白进行酶活性测定^[17], 酶反应原理见图 1, 该方法通过监测 NADH 的含量变化计算 TMK 的酶活性。100 μL 反应体系包含: $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dTMP, $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

MgCl_2 , $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH7.4), $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PEP, $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADH, pyruvate kinase 1.5 U, lactate dehydrogenase 1.5 U, $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP。测定纯化的蛋白浓度后, 取 3 μg 纯化的 TMK 蛋白于上述反应体系中, 37°C 下反应 60 min, 波长 340 nm 下测定 NADH 的浓度, 以单位时间 (min) 内 NADH 的消耗量作为 TMK 催化反应的反应速率, 最后于 98°C 水浴 5 min 终止反应。将蛋白纯化时的洗脱缓冲液作为阴性对照。每个测定样品设置 3 个重复, 利用 SPSS13.0 软件进行差异显著性检验。

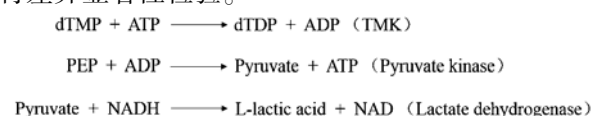


图 1 双酶分析法反应原理

1.2.5 大肠杆菌蛋白质的提取 大肠杆菌蛋白质的提取:收集 1 mL 菌体,加入 100 μ L TE 悬浮菌体,加入等体积的 2 \times SDS 上样缓冲液(5% SDS,10% β -巯基乙醇,30% 甘油,0.04% 溴酚蓝,1 mol \cdot L⁻¹ Tris-Cl pH 6.8)混匀,沸水浴 5 min, -20 $^{\circ}$ C 5 min,12 000 rpm 离心 10 min 后取上清。

1.2.6 蛋白质电泳分析 取 20 μ L 蛋白质上样液在分离胶为 12% 的聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,染色液(0.1% 考马斯亮蓝 R250,45% 甲醇,10% 冰醋酸)中充分染色,脱色液(45% 甲醇,10% 冰醋酸)中充分脱色。

1.2.7 免疫印迹分析 分离胶为 12% 的聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离蛋白质,在转移缓冲液(25 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl pH 8.3,192 mmol \cdot L⁻¹ 甘氨酸,10% 甲醇)中将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,在 4 $^{\circ}$ C 下,将膜在封闭缓冲液(TBST + 5% 脱脂奶粉)中封闭过夜, TBST 中洗膜 3 次,每次 10 min,在 6 \times His 标签单克隆抗体(一抗)中 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h(利用 TBST 稀释 200 倍),碱性磷酸酯酶标记的 A 蛋白(利用 TBST 稀释 2 500 倍)中 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,利用碱性磷酸酶底物显色试剂盒显色,蒸馏水中终止显色。

2 结果与分析

2.1 PaWBPS 株系 3 个 *tmk* 基因编码蛋白的氨基酸序列比对及相似性分析

PaWBPS *tmk-a-1*、*tmk-a-2* 和 *tmk-b* 基因大小分别为 639 bp、627 bp 和 624 bp,分别编码 212、208 和 207 个氨基酸, TMK-a-1、TMK-a-2 和 TMK-b 预测的蛋白分子量分别为 24.5 KDa、24.0 KDa 和 24.1 KDa,融合 6 \times His 标签后则分别为 25.4 KDa、24.9 KDa 和 25.0 KDa。对蛋白序列比对分析发现,和其他生物体的 TMK 蛋白类似, PaWBPS TMK-a-1、TMK-a-2 及 TMK-b 也含有三个保守功能域,即 N 端的磷酸基供体结合区(the phosphate-binding motif, P-loop)、核苷单磷酸结合区(TMP binding motif)和位于 C 端的磷酸供体结合位点(the LID domain)。从图 2 中还可以看到,在核苷单磷酸结合区(TMP binding motif)下游, PaWBPS TMK-a-1、PaWBPS TMK-a-2、WBD TMK-1(TMK-a)和 OY-W TMK-a 都比 PaWBPS TMK-b、WBD TMK-2(TMK-b)和 OY-W TMK-b 多了 6 个连续的氨基酸 KEKKQL(图 2 虚线

框所示);而在其上游, PaWBPS TMK-a-2、WBD TMK-1(TMK-a)、OY-W TMK-a 都比 PaWBPS TMK-b、WBD TMK-2(TMK-b)、OY-W TMK-b 少了 4 个连续的氨基酸 PALQ,而 PaWBPS TMK-a-1 在此处为 PQLK。

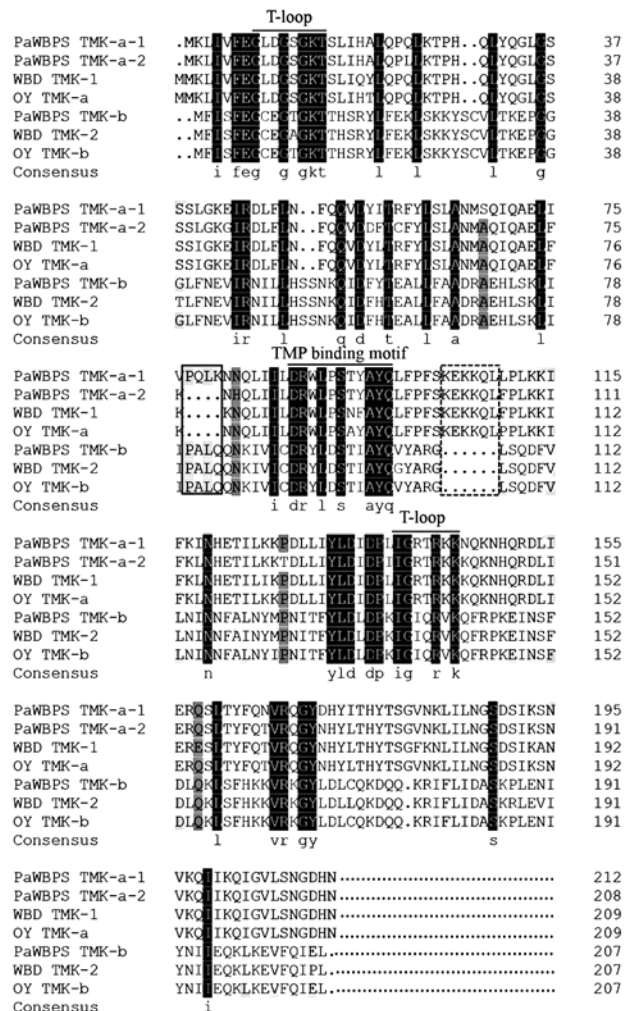


图 2 三个植原体的不同 TMK 蛋白氨基酸序列比对图

利用 DNAMAN 软件分析了泡桐丛枝(PaWB)、小麦蓝矮(WBD)、洋葱黄化(OY-W)植原体的 TMK-a、TMK-b 的氨基酸序列相似性值(表 2)。结果表明, PaWBPS TMK-b 与 WBD TMK-2(TMK-b)、OY-W TMK-b 之间的相似性分别为 95.65% 和 99.03%; PaWBPS TMK-a-1、PaWBPS TMK-a-2、WBD TMK-1(TMK-a)、OY-W TMK-a 之间的相似性为 87.32%~94.26%;而 PaWBPS、WBD 和 OY-W 三种植原体的 TMK-a 与 TMK-b 之间的相似性仅为 22.22%~25.95%。

表2 三种植原体不同 TMK 蛋白氨基酸序列相似性值矩阵

%

PaWBPS TMK-b	100						
WBD TMK-2(TMK-b)	95.65	100					
OY-W TMK-b	99.03	95.65	100				
PaWBPS TMK-a-1	25.46	25.93	25.46	100			
PaWBPS TMK-a-2	22.22	22.69	22.22	90.57	100		
WBD TMK-1(TMK-a)	22.58	23.04	22.58	87.32	89.95	100	
OY-W TMK-a	22.58	23.04	22.58	91.55	93.78	94.26	100

2.2 TMK-a-1、TMK-a-2 和 TMK-b 原核表达载体的构建

利用含有 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点的引物对 PaWBtmkaF-*Nco* I 和 PaWBtmkaR-*Xho* I 从连接有 *tmk-a-1* 和 *tmk-a-2* 的 pMD18-T 的载体上 PCR 扩增 *tmk-a-1* 和 *tmk-a-2* 的完整基因片段;同时利用含有 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点的引物对 PaWBtmkaF-*Nco* I 和 PaWBtmkaR-*Xho* I 从连接有 *tmk-b* 的 pMD18-T 的载体上扩增 *tmk-b* 的完整基因片段,PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果表明(图3),从 pMD18-T 载体上扩增到了大小约 630 bp 的 *tmk-a-1*、*tmk-a-2* 和 *tmk-b* 基因,而 ddH₂O 做模板的阴性对照未扩增到和 *tmk* 基因类似大小的片段。

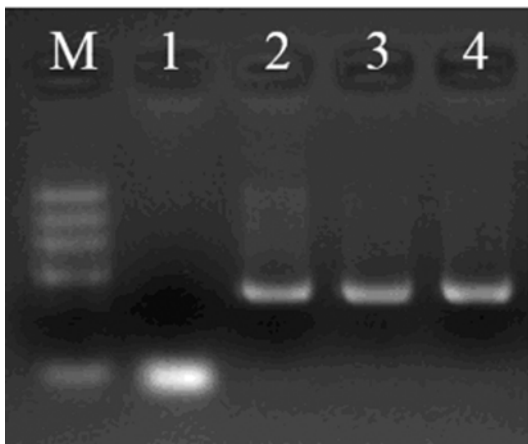


图3 PaWB *tmk-a-1*、*tmk-a-2* 和 *tmk-b* 基因的扩增
M:DNA 分子量标准;1: ddH₂O 阴性对照;2: *tmk-a-1* PCR 扩增产物;3: *tmk-a-2* PCR 扩增产物;4: *tmk-b* PCR 扩增产物。

图3 PaWB *tmk-a-1*、*tmk-a-2* 和 *tmk-b* 基因的扩增

将 *tmk-a-1*、*tmk-a-2* 和 *tmk-b* 的 PCR 扩增产物切割纯化回收,经 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切后连接到 pET28a 原核表达载体上,转化 BL21(DE3)感受态大肠杆菌。挑取单菌落摇菌后提取质粒,经 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定表明(图4),*tmk-a-1*、*tmk-a-2* 和 *tmk-b* 基因均成功的连接到 pET28a 原核表达载体

上。将构建的载体送北京华大基因研究中心和上海吉美生物医药科技有限公司测序发现,连接在 pET28a 载体上的 *tmk-a-1*、*tmk-a-2* 和 *tmk-b* 基因序列和原序列完全一致。将含有载体的 BL21(DE3)大肠杆菌保存于 -80℃ 冰箱中备用。

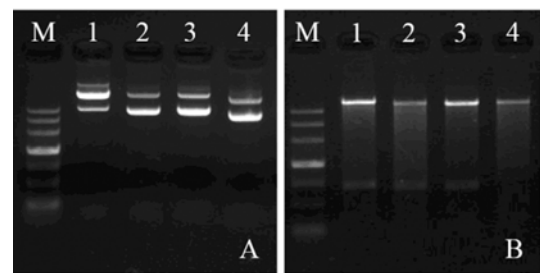


图4 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定
A:未经酶切的质粒;B:质粒经 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切。
M:DNA 分子量标准;1:连接有 *tmk-a-1* 基因的 pET28a 质粒;2:连接有 *tmk-a-2* 基因的 pET28a 质粒;3:连接有 *tmk-b* 基因的 pET28a 质粒;4:pET28a 空载体质粒。

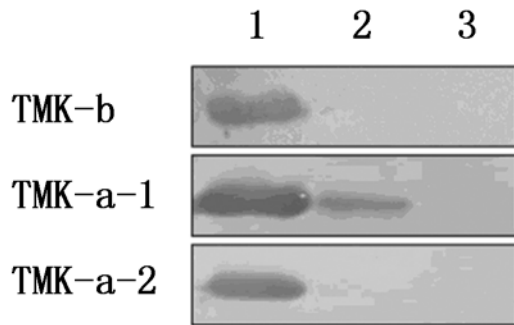
图4 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定

2.3 PaWBPS TMK-a-1、TMK-a-2 和 TMK-b 蛋白的表达及纯化

将保存在 -80℃ 冰箱中的 BL21(DE3)大肠杆菌于含有 Kan 抗生素的 LB 固体培养基中划线培养,挑取单菌落摇菌。用新的 LB 液体培养稀释菌液 1 000 倍,37℃ 摇菌 2 小时后加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol · L⁻¹,140 rpm 28℃ 摇菌 6 小时后收集菌体。

为了检测 TMK-a-1、TMK-a-2 和 TMK-b 的诱导表达效果,利用 6 × His 标签单克隆抗体进行了 Western blotting 实验,结果表明,在 IPTG 诱导的条件下,TMK-a-1、TMK-a-2 及 TMK-b 蛋白均被大量表达;在未加 IPTG 时,也能检测到 TMK-a-1 蛋白表达,但其明显低于诱导时的表达量,而在未加 IPTG 诱导的大肠杆菌中也未检测到 TMK-a-2 和 TMK-b 的表达;在不含外源基因的 pET28a 空载体对照组中,未检测到 3 种蛋白的表达(图5)。

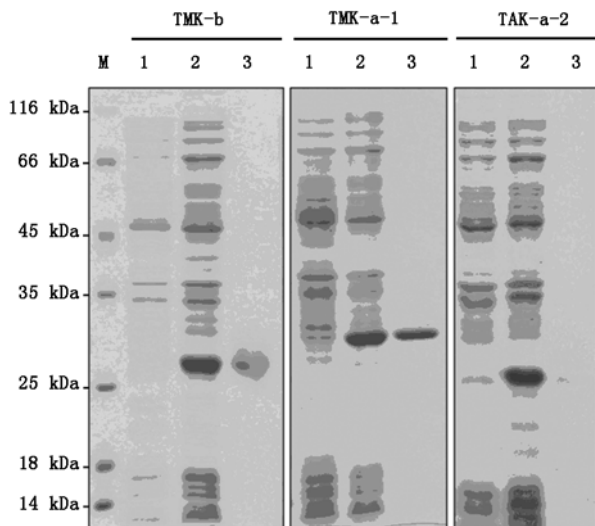
参照 QIAGEN Ni-NTA Fast Start Kit(30600)产



1: IPTG 诱导的 BL21 (DE3) 菌体总蛋白提取物; 2: 未加 IPTG 诱导的 BL21 (DE3) 菌体总蛋白提取物; 3: pET28a 空载体 BL21 (DE3) 菌体总蛋白提取物

图5 利用 6 × His 标签抗体进行的 Western blotting 结果

品说明书裂解收集的菌体,利用 Ni-NTA 亲和层析柱对过量表达的蛋白进行纯化,结果表明(图6), TMK-a-1、TMK-a-2 和 TMK-b 蛋白都成功地被纯化到, TMK-a-1 纯化的效率最高,而 TMK-a-2 和 TMK-b 的纯化产量较低,这可能由蛋白的结构不同造成的,也有可能是不同的蛋白所需的最适蛋白洗脱液的 pH 值、咪唑浓度等条件不同导致的^[18]。



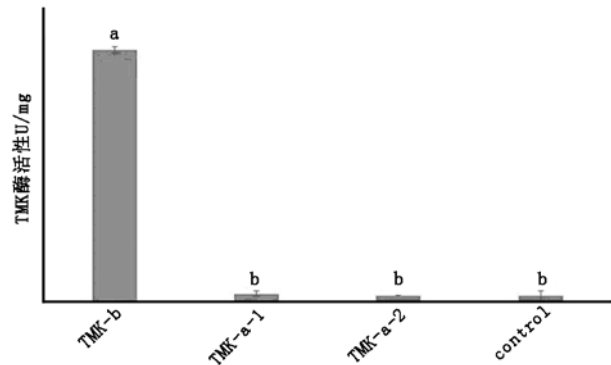
M: 蛋白分子量 Marker; 1: 未加 IPTG 诱导的菌体蛋白; 2: 加 IPTG 诱导的菌体蛋白; 3: 不含目的基因的菌体蛋白。

图6 利用 Ni-NTA 亲和层析柱对 3 种蛋白的纯化结果

2.4 PaWBPS TMK-a-1、TMK-a-2 和 TMK-b 酶活性的测定

采用双酶法对纯化后的蛋白 PaWBPS TMK-a-1、TMK-a-2 及 TMK-b 进行酶活性测定,结果表明, TMK-b 具有较高的酶活性,为 $85.96 \pm 0.74 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

mg^{-1} ; 而 TMK-a-1、TMK-a-2 以及空白对照(蛋白洗脱液)都几乎没有 TMK 激酶活性,酶活性值分别为: $2.96 \pm 0.74 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、 $2.23 \pm 0.00 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 $2.23 \pm 1.28 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。TMK-b 与 TMK-a-1、TMK-a-2 及空白对照(蛋白洗脱液)之间表现为显著性差异($P < 0.0001$),而 TMK-a-1、TMK-a-2 和空白对照三者之间没有显著性差异($P > 0.05$)(图7)。



control: 蛋白洗脱液作为空白对照。图中相同字母间差异不显著,不同字母间差异显著。

图7 PaWBPS 植原体的 TMK-a 和 TMK-b 酶活性测定结果

3 结论与讨论

本实验室前期研究发现,相比于洋葱黄化(OY-W)、小麦蓝矮(WBD)病等其他许多植原体^[10-14],泡桐丛枝植原体(PaWB)含有更丰富的 *tmk-a* 基因序列多态性;与其他植原体相似,*tmk-b* 基因序列单一。在前期研究的基础上,本研究首次对 PaWBPS TMK-a-1、TMK-a-2 和 TMK-b 进行了原核表达、蛋白纯化及酶活性测定。结果表明,PaWBPS TMK-b 蛋白具有较高的胸苷酸激酶(TMK)酶活性,为 $85.96 \pm 0.74 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$,而 PaWBPS TMK-a-1 和 PaWBPS TMK-a-2 没有明显的 TMK 酶活性。本研究结果和 Miyata 等对 OY-W TMK 的研究结果以及李蓓对 WBD TMK 的研究结果相一致^[11-12],也与我们在实验初期基于 PaWB、OY-W 和 WBD 的氨基酸序列相似性分析的结果做出的预测基本吻合,因为 PaWBPS TMK-b、OY-W TMK-b 及 WBD TMK-2(TMK-b)氨基酸序列间的相似性为 95.65%~99.03%,PaWBPS TMK-a-1、PaWBPS TMK-a-2、WBD TMK-1(TMK-a)及 OY-W TMK-a 之间的相似性为 87.32%~94.26%,而 PaWBPS、WBD、OY-W 三种植原体的 TMK-a 与 TMK-b 之间的相似性仅为 22.22%~

25.95%。虽然植原体 TMK-a 与 TMK-b 都含有 N 端的磷酸基供体结合区 (the phosphate-binding motif, P-loop)、核苷单磷酸结合区 (TMP binding motif)、位于 C 端的磷酸供体结合位点 (the LID domain) 三个保守功能域,但 TMK-a 和 TMK-b 序列间如此低的相似性可能导致了它们之间功能的差异或改变。例如,在支原体中^[19],dAMP 激酶不仅可以催化 dAMP,还能够催化 dCMP 和 dGMP。

作为基因表达主要产物的各种酶蛋白,在生命活动中的重要地位不言而喻。dTTP 是各种生物 DNA 合成的基础和前体化合物,而在细菌和植原体中缺乏从头合成途径,所以补救途径成为唯一提供脱氧嘧啶核苷酸的方式,用于 DNA 的合成、修复及线粒体 DNA 的复制^[5, 20]。本研究证明了 PaWBPS TMK-b 具有较高的体外测定酶活性,所以判断其对植原体的生长和繁殖会产生深远的影响,进而影响对寄主植物的致病和适应性。所以,深入了解植原体 *tmk* 基因表达与调控机理,不仅有助于揭示植原体繁殖和代谢规律,而且也有助于开发针对植原体病原的新型治疗药剂^[21]。

依据对 PaWBPS 的三个 TMK 蛋白酶活性测定的结果,进一步对其氨基酸序列细致的比对分析发现,TMK-a-1 和 TMK-a-2 二者的三个功能域完全一致,除了有 9 个不同位点的氨基酸变异外,TMK-a-2 还有一个四联体氨基酸残基缺失。而这一位点的四连体缺失在同样无活性的 WBD TMK-1 和 OY-W TMK-a 中也缺失。Miyata 和李蓓在分析 OY-W 和 WBD 植原体的 TMK-a 几乎没有酶活性的原因时指出^[11-12],相比于 TMK-b, TMK-a 在核苷单磷酸结合区 (TMP binding motif) 上游少的四连体氨基酸残基:脯氨酸-丙氨酸-亮氨酸-谷氨酰胺 (PALQ) 可能导致了 TMK-a 活性的消弱。而 PaWBPS TMK-a-1 序列在此位点上出现两个氨基酸的替换,即第二位氨基酸由丙氨酸 A 至谷氨酰胺 Q,第四位由谷氨酰胺 Q 至赖氨酸 K,即由 PALQ 替换成了 PQLK; 所以我们据此在实验之初曾假设 TMK-a-1 会与 OY-W TMK-b 和 WBD TMK-1 一样具有 TMK 活性,而本研究的结果否定了该假设。然而因该四连体已有两个氨基酸的替换,所以也不能排除该替换与酶活性的丧失有关。另外,在 27、28 位氨基酸和 52、53 位氨基酸的缺失是否影响酶的活性也不得而知。另一个特别值得关注的氨基酸序列变化发生在核苷单磷酸

结合区 (TMP binding motif) 下游, PaWBPS TMK-a-1、PaWBPS TMK-a-2、OY-W TMK-a 和 WBD TMK-1 与具有活性的三个植原体的 TMK-b 相比均多出了连续的 6 个氨基酸:赖氨酸-谷氨酸-赖氨酸-赖氨酸-谷氨酰胺-亮氨酸 (KEKKQL), 这段多肽的插入是否影响酶活性也很值得深入探讨,因而不排除核苷单磷酸结合区 (TMP binding motif) 上下游序列的改变共同导致了酶活性的变化。

许多研究报道表明 TMK 蛋白的氨基酸序列的变异会直接影响到蛋白质的二级和三级结构,进而影响酶蛋白活性的有无和强弱^[21-24]。另外,细胞是一个复杂而又精巧的单元,在体外没有测出植原体 TMK-a 酶活性并不能说明 TMK-a 在植原体细胞内没有酶活性或功能,比如大肠杆菌本身的 TMK 蛋白作为一个二聚体在细胞生长过程中处于低水平表达状态,表达蛋白仅占菌体总可溶性蛋白的 0.01%, 这比大量存在的核苷单磷酸激酶 (nucleoside monophosphate kinase) 低 10~20 倍^[25]; 而且也可能存在与 TMK 共同发挥作用的蛋白复合体,它们共同参与核苷酸前体的合成和 DNA 复制^[5]。徐启聪的研究结果显示^[26],与 PaWB *tmk-a* 同源的枣疯植原体 *tmk* 基因存在着与地理环境和品种相关的不同基因型。因此,植原体 TMK-a 的功能还有待于深入的研究。其中,通过基因差异位点突变和酶活性测定分析或通过对不同蛋白晶体的立体结构的解析、底物结合和催化部位的比较分析,可能是全面揭示不同基因编码蛋白氨基酸序列变异的本质和意义的重要途径^[27-28]。虽然本实验室之前也开展过多种植原体基因的原核表达,但原核表达蛋白回收和纯化都是通过切胶方式,获得蛋白往往纯度较低,而且这些基因的原核表达产物皆未完成蛋白功能的准确验证^[29-30]; 而 TMK 是迄今泡桐丛枝植原体上唯一被验证功能的蛋白。所以,本研究所建立起的 TMK 蛋白原核表达、Ni-NTA 亲和层析蛋白纯化与胸苷酸激酶活性的测定技术体系,下一步深入开展这方面的研究奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] Tian G Z, Raychauduri, S P. Paulownia witches' broom disease in China: present status. In *Forest Trees and Palms; Diseases and Control* [M], Oxford, IBH, 1996: 227-251.
- [2] Gesing A, Modrzejewska H, Kathowmik M, et al. Thymidine kinase and adenosine kinase activities in homogenates of thyroid lobes in

- hemithyroidectomized rates affects of melatonin in vitro [J]. *neuroendocrinology letters*, 2000, 21(6):453-459.
- [3] Pallack J, Williams M, McElhane R, *et al.* The comparative metabolism of the mollicutes: the utility for taxonomic classification and the relationship of pupative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 1997, 23:269-354.
- [4] Ronceret A, Gadea-Vacas J, Guillemot J, *et al.* The first zygotic division in *Arabidopsis* requires de novo transcription of thymidylate kinase [J]. *The Plant Journal*, 2008, 53: 776-789.
- [5] Sclafani R A, Fangman W L. Yeast gene CDC8 encodes thymidylate kinase and is complemented by herpes thymidine kinase gene TK [J]. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 1984, 81: 5821-5825.
- [6] White J H, Green S R, Barker D G, *et al.* The CDC8 transcript is cell cycle regulated in yeast and is expressed coordinately with CDC9 and CDC21 at a point preceding histone transcription [J]. *Experimental Cell Research*, 1987, 171: 223-231.
- [7] Bueno R V, Braya R C, Segretti N D, *et al.* New Tuberculostatic agents targeting nucleic acid biosynthesis: drug design using QSAR approaches [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2014, 20: 4474-4485
- [8] Doharey P K, Suthar M K, Verma A, *et al.* Molecular cloning and characterization of *Brugia malayi* thymidylate kinase [J]. *Acta Tropica*, 2014, 133:83-92.
- [9] Guinaraes A P, Ramolho T C, Franca T E. Preventing the return of smallpox: molecular modeling studies on thymidylate kinase from *Variola virus* [J]. *Journal of Biomolecular structure & Dynamics*, 2013, DOI: 10.1080/07391102.2013.830578.
- [10] 江施幸. 丝瓜簇叶病植物菌质体胸苷酸激酶基因 (tmk) 之表现及特性研究 [D]. 国立中央大学硕士论文, 2001.
- [11] Miyata S, Oshima K, Kakizawa S, *et al.* Two different thymidylate kinase gene homologues, including one that has catalytic activity, are encoded in the onion yellows phytoplasma genome [J]. *Microbiology*, 2003, 149: 2243-2250.
- [12] 李蓓, 纪玲玲, 吴云峰, 等. 小麦蓝矮病植原体胸苷酸激酶基因的分离、原核表达及酶活性分析 [J]. *微生物学报*, 2008, 48(6):739-744.
- [13] Bai X, Zhang J, Ewing A. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 (10): 3682-3696.
- [14] Jomantiene R, Davis R E. Clusters of diverse genes existing as multiple, sequence-variable mosaics in a phytoplasma genome [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2006, 255 (1):59-65.
- [15] 宋传生, 胡佳续, 林彩丽, 等. 泡桐丛枝植原体胸苷酸激酶基因的克隆及序列分析 [C]. 中国植物病理学会 2012 年学术年会论文集, 2013:303.
- [16] 田国忠, 温秀军, 李永, 等. 枣疯病和泡桐丛枝病植原体不同分离物组织培养保藏和嫁接传病试验比较 [J]. *林业科学研究*, 2005, 18(1):1-9.
- [17] Berghauer J. A reactive arginine in adenylate kinase [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 1975, 397:370-376.
- [18] 李淑娟. 六聚组氨酸融合蛋白纯化方法研究 [D]. 西北大学硕士学位论文, 2007.
- [19] Wang L, Westberg J, Bolske G, *et al.* Novel deoxynucleoside-phosphorylating enzymes in mycoplasmas: evidence for efficient utilization of deoxynucleosides [J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 42:1065-1073.
- [20] Collins CM, Olstad K, Sterud E, *et al.* Isolation of a novel fish thymidylate kinase gene, upregulated in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following infection with the monogenean parasite *Gyrodactylus salaris* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 23: 793-807.
- [21] Muhier-Lehmann H, Chaffotte A, Pochet S, *et al.* Thymidylate kinase of *Mycobacterium tuberculosis*: a chimera sharing properties common to eukaryotic and bacterial enzymes [J]. *Protein Science*, 2001, 10:1195-1205.
- [22] Brundiers R, Lavie A, Veit T, *et al.* Modifying human thymidylate kinase to potentiate azidothymidine activation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274:35289-35292.
- [23] Reynes J P, Tiraby M, Baron M, *et al.* *Escherichia coli* thymidylate Kinase: molecular cloning, nucleotide sequence, and genetic organization of the corresponding tmk Locus [J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178:2804-2812.
- [24] Balasubramaniam N K, Veerisetty V, Gentry G A. Herpesviral deoxythymidine kinases contain a site analogous to the phosphoryl-binding arginine-rich region of porcine adenylate kinase; comparison of secondary structure predictions and conservation [J]. *Journal of General Virology*, 1990, 71:2979-2987.
- [25] Chaperon D N. Construction and complementation of in-frame deletions of the essential *Escherichia coli* thymidylate kinase gene [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72:1288-1294.
- [26] 徐启聪. 中国不同地区不同枣树品种上枣疯病植原体的分子鉴定及变异分析 [D]. 中国林业科学研究院硕士学位论文, 2009.
- [27] Ostermann N, Schlichting I, Brundier R, *et al.* Insights into the phosphoryltransfer mechanism of human thymidylate kinase gained from crystal structures of enzyme complexes along the reaction coordinate [J]. *Structure*, 2000, 8:629-642.
- [28] Tourneux L, Bucurenci N, Lascu I, *et al.* Substitution of an alanine residue for glycine 146 in TMP kinase from *Escherichia coli* responsible for bacterial hypersensitivity to bromodeoxyuridine [J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(16):4291-4293.
- [29] 牟海青, 周涛, 赵文军, 等. 泡桐丛枝植原体抗原膜蛋白抗血清的制备及应用 [J]. *植物病理学报*, 2011, 41(2):161-170.
- [30] Wang J, Zhu X P, Gao R, *et al.* Genetic and serological analyses of elongation factor EF-Tu of paulownia witches'-broom phytoplasma (16Srl-D) [J]. *Plant Pathology*, 2010, 59:972-981.