

二价铜离子对牛正常朊蛋白 二级结构的影响*

陈微涛¹ 王大伟¹ 饶子和² 田波^{1**}

1. 中国科学院微生物研究所分子病毒学研究室, 北京 100080; 2. 清华大学结构生物学研究所, 北京 100084

摘要 研究了二价铜离子对牛朊蛋白的二级结构的影响. 牛朊蛋白(BoPrP^c)的小分子(BoPrP^cS)和大分子(BoPrP^cL)经初步纯化后,在含Cu²⁺的碱性溶液中氧化,用反相柱进行氧化态和还原态的BoPrP^cL和BoPrP^cS的分离. 质谱分析证明氧化态的BoPrP^cL和BoPrP^cS分子质量分别为24.064,15.819 ku. 用远紫外圆二色谱(Far-UV CD)分析显示,BoPrP^cS在208和222 nm处出现两个负峰,为典型的 α -螺旋型结构;而BoPrP^cL在222 nm处负峰减小. 与未经氧化的BoPrP^cL的质谱和CD结果比较后发现,氧化后的BoPrP^cL在八肽重复区结合了6个Cu²⁺,其 β -折叠含量明显增加. 而Cu²⁺对BoPrP^cS二级结构基本无影响. BoPrP^cL结合Cu²⁺的特性及其二级结构的相应变化可能与细胞内抗Cu²⁺毒性与氧化压力有关.

关键词 牛朊蛋白 二价铜离子 氧化还原型 二级结构

致病性朊病毒引起可转移性神经退化疾病,例如:羊瘙痒病,牛海绵状脑病(俗称疯牛病),人库鲁病和克雅氏病. 朊病毒导致一类非常特殊的疾病,每一种哺乳动物的基因组中都有朊蛋白(PrP^c)基因,所表达的PrP^c是不致病的,只有当大量PrP^c发生错误折叠形成致病的朊病毒(PrP^{sc})时才发病. 但PrP^c的生理功能还不清楚. 最近实验表明PrP^c具有超氧化物歧化酶的活性,在体内有抗氧化作用,其活性与PrP^c络合Cu²⁺密切相关,并且推测络合Cu²⁺的位点在PrP^c的八肽重复区^[1].

本研究在以前工作基础上^[2,3]成功地亚克隆. 表达和纯化了缺少N, C端信号肽和大部分八肽重复区的BoPrP^cS及已报道的BoPrP^cL^[3]. 利用飞行时间质谱和远紫外CD谱分析了两种分子络合Cu²⁺的特性及Cu²⁺对其二级结构的影响.

1 材料和方法

1.1 BoPrP^cS亚克隆的构建

根据BoPrP^cS的DNA序列^[4]设计引物:5'CGGGATCCCATATGGGTGGTACCCACGGTC AAT,3'GGGAATTCTATTAA CTTGC CCCTCGTTGGTA,以pUC19BoPrP^c质粒^[2]为模板,进行PCR扩增,反应条件:第1步94℃ 3 min;第2步94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s; 30个循环;第3步72℃

2001-03-09 收稿,2001-05-08 收修改稿

* 国家重点基础研究发展规划(编号:G1999075602)和农业部“九四八”(批准号:982078)资助项目

** 联系人, E-mail: tienpo@sun.im.ac.cn

10 min. PCR 产物与质粒 pUC19 同时用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切. 含有目的基因的酶切片段经回收, 与 pUC19 连接, 转化 *E. coli* DH5 α 后所得的克隆用 PCR 检测. 阳性克隆经测序鉴定, 称谓 pUC19BoPr^oS.

1.2 表达载体的构建与表达

质粒 pUC19BoPr^oS 和 pET-30a(本室保存), 经 *Nde* I 和 *Eco*R I 酶切, 目的片段与 pET-30a 连接, 转化 *E. coli* DH5 α 后所得克隆为 pET30aBoPr^oS. 应用转化贮存液(TSS)制备感受态的 *E. coli* BL21 (DE3), 将质粒 pET30aBoPr^oS 和 pET30aBoPr^oL^[3] 转入其中. 然后用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导蛋白表达, 诱导方法, 菌体破碎和包涵体的洗涤方法见文献[3].

1.3 BoPr^oS 和 BoPr^oL 的纯化

阳离子交换层析: 洗涤后的包涵体溶解在起始缓冲液(20 mmol/L 醋酸钠, 8 mol/L 尿素, 0.1 mol/L DTT pH5.6) 中, 离心并过滤除去不溶解物. 利用 Bio-CAD 灌注层析系统的 POROS 20HS 阳离子交换柱纯化 BoPr^oS. 洗脱缓冲液是在起始缓冲液中加入终浓度为 1 mol/L 的 NaCl. 层析条件: 流速 3 mL/min, 洗脱体积 35 mL, 洗脱梯度为 0~500 mmol/L NaCl, 纯化后蛋白经 SDS-PAGE 检测.

氧化: 将纯化的 BoPr^oS 溶液的 pH 调至 8.0, 浓度稀释为 800 mg/L, 加入 CuSO₄ 使 Cu²⁺ 的终浓度达 1 μ mol/L, 暴露于空气中搅拌 16 h. 将样品溶液过滤除去沉淀, 利用 Millipore 公司的 Biomax-5 浓缩.

反相层析纯化: 上述浓缩样品利用反相介质 POROS R₂ 在 Bio-CAD 工作站上分离氧化型和还原型 BoPr^oS. 洗脱体系的 A 液为 0.1% 三氟乙酸水溶液; B 液为含 0.09% 三氟乙酸的乙腈溶液. 洗脱时 A 液和 B 液混合, 进行 0~60% B 液的连续梯度洗脱. SDS-PAGE 检测产物.

BoPr^oL 的纯化过程同 BoPr^oS, 在阳离子交换层析中使用 pH6.0 的醋酸钠缓冲液.

1.4 BoPr^oS 和 BoPr^oL 的复性

将纯化得到的氧化型 BoPr^oS 和 BoPr^oL 用含 8 mol/L 尿素的 20 mmol/Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液调整浓度至 100 mg/L. 在 20 mmol/Tris-HCl pH8.0 的透析液中透析过夜; 更换透析液, 继续透析 8 h, 然后用 PEG20000 反透析浓缩. 样品冻干备用. 未经 Cu²⁺ 氧化获得的 BoPr^oL 的纯化与复性方法见文献[3].

1.5 质谱分析

取冻干样品溶于基质溶液(含 α -氰基肉桂酸和二羟基苯甲酸的氯仿), 1 μ L 样品溶液加在 BIFLEX III 型 MALDI-TOF 质谱仪的样品靶上, 待溶剂挥发后送入质谱仪进行质谱分析, 加速电压为 19.5 kV, 反射器电压为 20 kV, 延时引出电压为 14.5~16.5 kV, 延迟时间为 50~200 ns. 累加 10~50 次单次扫描信号得到质谱图.

1.6 圆二色谱分析

冻干前将反透析所得样品经 12000 r/min 离心 30 min, 用 0.22 μ m 滤膜过滤去除沉淀, 稀释至终浓度 400 mg/L. 样品在 Jasco715 型圆二色谱仪上测试, 扫描范围为 190~250 nm.

2 结果

2.1 BoPr^oS 的纯化

pET30aBoPr^oS 表达产物 BoPr^oS 为包涵体形式, 经计算机计算其等电点为 8.6. 经

POROS 20HS 阳离子柱洗脱收集的 BoPrP^cS 经 SDS-PAGE 检测确定纯度为 80% 左右。反相层析时氧化型的 BoPrP^cS 在 40% B 液洗脱时开始出现, 还原型的 BoPrP^cS 在 42% B 液洗脱时流出 (图 1)。

经 SDS-PAGE 检测氧化型 BoPrP^cS 的纯化产物纯度达 90% 以上, 见图 2。

2.2 质谱分析

根据质谱结果 BoPrP^cS 的分子质量为 15.819 ku (图 3(a))。经 Cu²⁺ 氧化获得的 BoPrP^cL 分子质

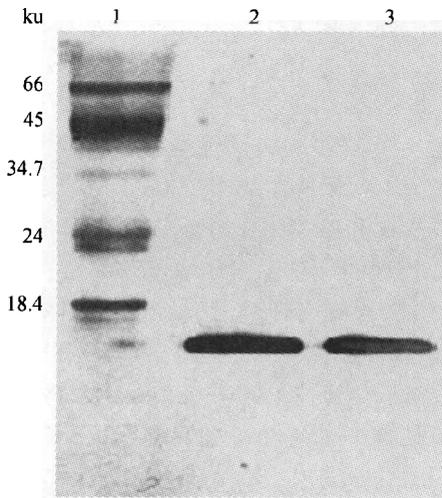


图 2 BoPrP^cS 反相纯化后 SDS-PAGE 电泳结果
1 蛋白分子质量标准; 2~3 反相纯化后的 BoPrP^cS

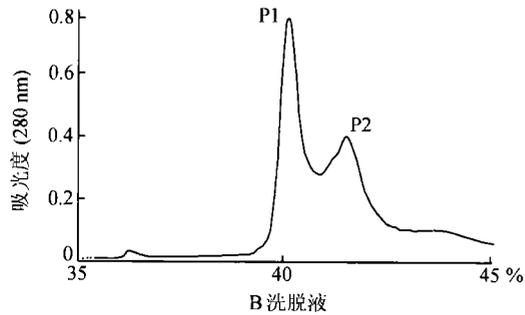


图 1 BoPrP^cS 的反相层析洗脱图

P1 为氧化型 BoPrP^cS, P2 为还原型 BoPrP^cS

量为 24.064 ku (图 3(b))。未经 Cu²⁺ 氧化获得的 BoPrP^cL 分子质量为 23.630 ku, 与文献[3]报道相符。

2.3 远紫外圆二色谱分析

在 Jasco715 圆二色谱仪上, 氧化型的 BoPrP^cS 经 190~250 nm 远紫外扫描显示, 在 208 和 222 nm 附近出现两个负峰, 为典型的 α -螺旋型结构 (图 4(a))。经 Yang-Chen 氏公式^[5] 计算, 含 55.7% α -螺旋, 8.4% β -折叠, 20.6% 无规卷曲, 15.3% 转角。未经 Cu²⁺ 氧化获得的 BoPrP^cL 含 36.1% α -螺旋, 11.9% β -折叠, 19.0% 无规卷曲, 33.0% 转角^[3]; 而经 Cu²⁺ 氧化获得的 BoPrP^cL 远紫外圆二色谱结果显示 BoPrP^cL 在 208 nm 处有一负峰, 222 nm 处负峰变小, 含 28.8% α -螺旋, 35.6% β -折叠, 35.6% 无规卷曲, 没有转角 (图 4

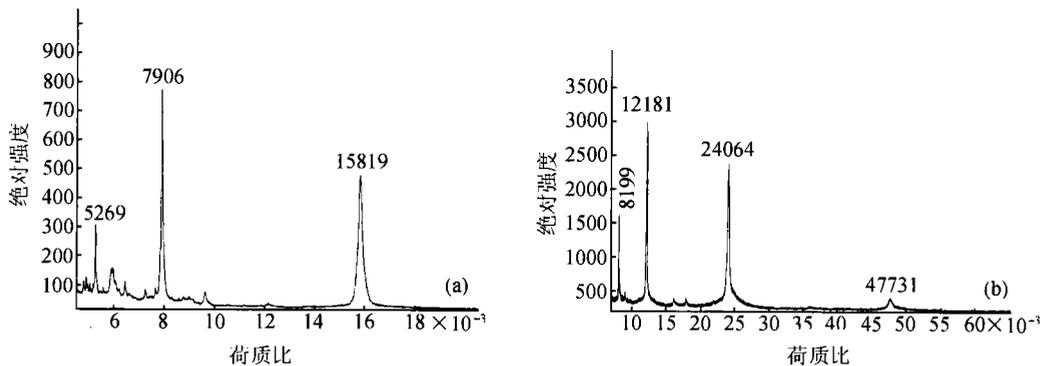


图 3 质谱分析图

(a) 经 Cu²⁺ 氧化后的 BoPrP^cS; (b) 经 Cu²⁺ 氧化后的 BoPrP^cL

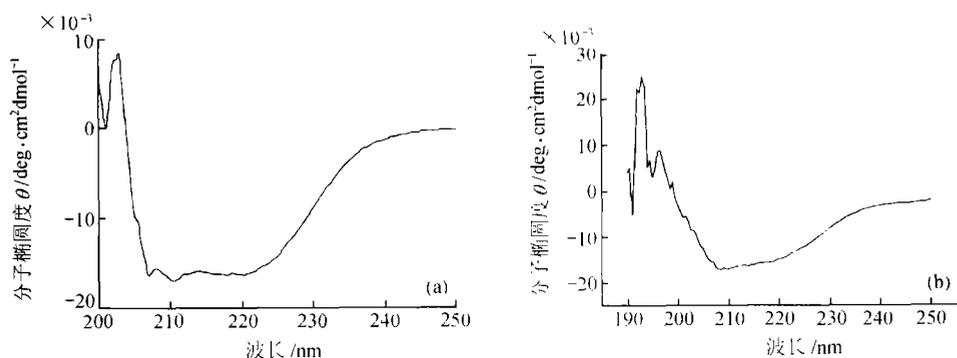


图 4 远紫外圆二色谱扫描结果

(a)经 Cu^{2+} 氧化后 BoPrP^{S} ; (b)经 Cu^{2+} 氧化的 BoPrP^{L}

3 讨论

金属离子在生物的正常生命活动中扮演着重要角色. 在许多酶的活性中心存在着低量的金属离子, 例如: 超氧化物歧化酶(SOD)中的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} , 固氮酶中的 Mo^{2+} . Cu^{2+} 的缺乏和紊乱可引起人类和动物中枢神经系统的疾病. 例如在 Menkes 和 Wilson 病中, 因为 Cu^{2+} 的代谢异常引起中枢神经系统神经元的降解^[6,7]. 用 Cuprizone 处理的小鼠可出现像羊瘙痒症中的神经元海绵状降解和星形细胞胶质化^[8,9]. 有实验表明, Cu^{2+} 可结合于直接从动物脑中提取的或体外重组表达的 PrP^{C} , 并与其中的组氨酸螯合^[10,11].

在优化纯化条件后, 用 pH5.6 的醋酸钠缓冲液在阳离子交换柱 POROS 20HS 上 BoPrP^{S} 可得到较好的纯化效果. 利用含 Cu^{2+} 的碱性溶液氧化, 可使部分二硫键键合. 利用反相层析的方法, 一方面除去盐, 另一方面可将氧化型与还原型的 BoPrP^{S} 分开, 有利于透析复性, 减少沉淀生成, 形成正确的折叠产物.

将未经 Cu^{2+} 氧化和氧化获得的 BoPrP^{L} 复性样品分别进行质谱分析. 未经 Cu^{2+} 氧化获得的复性样品 BoPrP^{L} 分子质量为 23.630 ku, 计算机推算分子质量为 23.687 ku, 两者数值很接近. 而 Cu^{2+} 氧化获得的 BoPrP^{L} 复性样品分子质量为 24.064 ku, 比预测的分子质量要高得多. 实验中也发现将冻干的经 Cu^{2+} 氧化获得的 BoPrP^{L} 直接溶解在含 EDTA 的溶液中比直接溶解在不含 EDTA 的同样溶液中要更易出现沉淀. 可能 EDTA 络合金属离子而使蛋白沉淀. 对 BoPrP^{L} 分子上结合的 Cu^{2+} 的数目, 通过分子质量的差异计算可知氧化后的 BoPrP^{L} 大约结合了 6 个 Cu^{2+} . 这与文献报道相吻合^[12]. 质谱测试 Cu^{2+} 氧化获得的 BoPrP^{S} 的分子质量为 15.819 ku, 与计算机预测分子质量 15.883 ku 基本相符. 可见未络合 Cu^{2+} . 说明 Cu^{2+} 主要结合部位在八肽重复区. Cu^{2+} 对 BoPrP^{L} 二级结构的影响可通过远紫外圆二色谱分析得出. 未经 Cu^{2+} 氧化获得的 BoPrP^{L} 复性样品的远紫外圆二色谱显示, 在 208, 222 nm 处有双负峰, 为典型的高 α -螺旋含量的谱型. 经 Yang-Chen 公式计算含 α -螺旋 36.1%, 与文献报道 40% 的 α -螺旋接近. 而经 Cu^{2+} 氧化获得的 BoPrP^{L} 复性样品的远紫外圆二色谱与之有很大的不同, 从图 4(b)上看到 222 nm 处的负峰变小, 208 nm 处的负峰依然存在, 说明其 α -螺旋含量减少. 计算与比较后得出, α -螺旋含量减少了 8%, 转角消失了, 而 β -折叠含量却升高了将近一倍, 这说明 Cu^{2+} 的结合更有利于 β -折叠的形成. 同样条件经 Cu^{2+} 氧化获得的 BoPrP^{S} 的远紫外圆

二色谱显示,在 208,222 nm 处有双负峰,且 222 nm 处的峰没有向上抬升,BoPrP^cS 为典型的高 α -螺旋含量的蛋白,与报道类似片段 α -螺旋含量相似^[13]。Cu²⁺ 氧化对 BoPrP^cS 二级结构无大影响。

由以上 BoPrP^cL 和 BoPrP^cS 的质谱,远紫外圆二色谱结果证明 BoPrP^cL 氧化后结合了大约 6 个 Cu²⁺,并且络合部位在八肽重复区。Smith 等利用 CD 对 50~89 位氨基酸残基的八肽区重复片段的研究表明:八肽区采用一种无规则的延伸型构象,缺少确定的二级结构^[14]。我们的结果说明 Cu²⁺ 结合于八肽重复区后,稳定了结构,同时也改变了二级结构,使 β -折叠增多。二级结构的变化可能与 PrP^c 的生理功能有关。有实验证明 PrP^c 有 SOD 活性^[1]。这些结构上的变化有可能为其活性所必须。这需要实验进一步证实。

参 考 文 献

- 1 Brown D R, et al. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J*, 1999, 344: 1
- 2 王大伟,等. 中国牛朊病毒基因的克隆和序列分析. *微生物学报*, 1998, 38(6):417
- 3 Wang D W, et al. High-level expression and secondary structure analysis of the bovine mature prion protein. *Chinese Science Bulletin*, 2000, 45(14): 398
- 4 Korth C, et al. Prion (PrP^{sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature*, 1997, 390: 74
- 5 Chen Y H, et al. Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochemistry*, 1972, 11(22):4120
- 6 Bull P C, et al. The Wilson disease gene is a putative copper transporting p-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genetics*, 1993, 5(4): 327
- 7 Wu J, et al. The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. *Nature Genetics*, 1994, 7(4): 541
- 8 Kimberlin R H, et al. A comparison of the biochemical changes induced in mouse brain cuprizone toxicity and by scrapie infection. *J Comput Pathol*, 1974, 84(2): 263
- 9 Pattison I H, et al. Clinical and histological observations on cuprizone toxicity and scrapie in mice. *Res Vet Sci*, 1971, 12(4): 378
- 10 Pan K M, et al. Conversion of α -helix into β -sheet features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:10962
- 11 Hornshaw M P, et al. Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: Structural studies using synthetic peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 214:993
- 12 Brown D R, et al. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, 1997, 390 : 684
- 13 Jackson G S, et al. Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrilogenic conformations. *Science*, 1999, 283(19): 1935
- 14 Smith C J, et al. Conformational properties of the prion octa-repeat and hydrophobic sequences. *FEBS Lett*, 1997, 405: 378

公 告

《自然科学进展》和《Progress in Natural Science》期刊于 2002 年起将两刊全文入网“万方数据-数字化期刊群”(www.wanfangdata.com.cn)。所有在两刊发表文章的作者,将由编辑部统一纳入“万方数据-数字化期刊群”,进入因特网信息服务系统。欢迎读者和作者浏览。

本刊编辑部