

Salsolinol 合成酶的克隆和表达

冯程程, 陈薛钗, 刘可夫, 曾凡, 庆宏, 邓玉林

北京理工大学生命学院, 北京 100081

摘要 Salsolinol 合成酶是一种催化多巴胺和乙醛生成 Salsolinol 的酶, 与帕金森病发病机制密切相关。研究发现 Salsolinol 合成酶与泛素的氨基酸序列高度相似, 只有 4 个氨基酸位点有差异。本研究以泛素基因为模板, 采用聚合酶链式反应技术对 4 个位点进行定点突变, 将突变基因片段克隆到载体 pET30a-GST 上, 构建 pET30a-GST-Sal synthase 重组载体, 转化 BL21 后, IPTG 诱导重组菌表达融合蛋白, 经亲和层析柱纯化。结果表明, 实现目的位点的定点突变, 获得 Sal 合成酶基因, 成功构建了 GST-Sal synthase 原核表达质粒, 在大肠杆菌中表达纯化后得到较高纯度的 GST-Sal synthase 融合蛋白。

关键词 Salsolinol 合成酶; 定点突变; 克隆表达; 蛋白纯化

中图分类号 Q78

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2015.08.012

Cloning and expression of Salsolinol synthase

FENG Chengcheng, CHEN Xuechai, LIU Kefu, ZENG Fan, QING Hong, DENG Yulin

School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

Abstract The Parkinson's disease (PD) is a common progressive neurodegenerative disorder. The main pathological characteristics of the PD are the selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra and the formation of Lewy bodies. The MPTP (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine) is a kind of much studied exogenous neurotoxins, known to cause parkinsonism in humans with selective neurotoxicity to dopamine neurons in the substantia nigra. The induction of the parkinsonism in humans by the MPTP suggests that endogenous or xenobiotic neurotoxins may elicit the Parkinson's disease. The salsolinol, a very similar kind of the MPTP, is a type of products from the condensation of the aldehydes and dopamine (DA) and has neurotoxicity. The reaction of the DA and the acetaldehyde to obtain the salsolinol is an enzyme reaction. The salsolinol synthase is an enzyme for synthesizing the salsolinol from dopamine and acetaldehyde. It is closely related to the pathogenesis of the Parkinson's disease (PD). The previous research shows that the Sal synthase sees a high amino acid similarity to the ubiquitin, with only difference of four amino acids between Sal synthase and ubiquitin. The finding reveals that the enzyme may play an important role in the cell process. The salsolinol synthase gene is obtained through the site-directed mutagenesis with the ubiquitin gene by the long primer polymerase chain reaction (PCR). The mutation gene is cloned into the prokaryotic GST fusion protein expression plasmid pET30a-GST, to form the pET30a-GST-Sal synthase plasmid. The recombinant plasmid is transformed to E.coli BL21 and the expression of the GST-Sal synthase fusion protein is induced by the IPTG. The protein is purified through the affinity chromatography methods. It is shown that the four site mutations are fully consistent with the expected results, and a prokaryotic system expressing the GST-Sal synthase fusion protein is successfully constructed. The GST-Sal synthase fusion protein with high purity could be obtained after it is high efficiently expressed in the *E. coli* BL21 and purified with the affinity chromatography.

Keywords Salsolinol synthase; site-directed mutagenesis; cloning and expression; protein purification

帕金森病(Parkinson disease, PD)是一种常见于中老年人的中枢神经系统退行性疾病, 主要病理变化是中脑黑质致密

部多巴胺能神经元的进行性缺失并在残存的神经元中出现嗜酸性路易小体(Lewy body)^[1]。1983年Langston等^[2]报道了

收稿日期: 2015-01-26; 修回日期: 2015-02-06

基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项(2012YQ040140)

作者简介: 冯程程, 硕士研究生, 研究方向为分子生物学, 电子邮箱: fengchengcheng0207@126.com; 庆宏(通信作者), 教授, 研究方向为神经退行性疾病,

电子邮箱: hqing@bit.edu.cn; 邓玉林(共同通信作者), 教授, 研究方向为神经退行性疾病, 电子邮箱: deng@bit.edu.cn

引用格式: 冯程程, 陈薛钗, 刘可夫, 等. Salsolinol 合成酶的克隆和表达[J]. 科技导报, 2015, 33(8): 73-76.

1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶(MPTP)能引起帕金森病以来,人们就开始广泛关注神经毒素与帕金森病之间的关系。儿茶酚异喹啉物质 Salsolinol(1-甲基-6, 7-二羟基-1, 2, 3, 4-四氢异喹啉, Sal)作为外源神经毒素 MPTP 的结构类似物从而引起人们的广泛关注^[3]。自从在经左旋多巴(L-DOPA)治疗的 PD 患者尿液中首次检测出 Salsolinol 后^[4],又在脑组织和脑脊液(CSF)中发现了 Sal^[5],其对多巴胺能神经元的毒性作用在体内和体外实验中均得到证实^[6]。由于 Sal 不能透过血脑屏障^[7],因此推断它是一种内源性的儿茶酚异喹啉物质^[8]。Sal 分子具有手性异构体,其分子中 C1 位为手性中心,由此可分为(R)型和(S)型构象^[9]。Sal 对映体主要以 R 型存在于哺乳动物脑组织中^[10],由于酶催化反应具有立体选择性,表明 Sal 可能是由酶促反应合成的。研究表明 Sal 可由两种途径合成,一种是非酶促 Pictet-Spengler 反应生成外消旋 Sal^[11],另一种是通过 Sal 合成酶催化反应生成具有立体专一性的(R)-Sal^[12,13]。

Sal 合成酶可催化多巴胺(DA)和乙醛生成 Salsolinol^[12],是脑内合成 Salsolinol 及其衍生物的关键酶。Chen 等^[14]首次发现 Sal 合成酶存在于鼠脑中,并对鼠脑中 Sal 合成酶进行了分离纯化。对 Sal 合成酶进行酶学性质研究结果表明:Sal 合成酶的最适温度为 37℃,耐热性较好;最适 pH 值为 7.4,等电点为 6.6^[15]。通过质谱鉴定获得其理论氨基酸序列如下:MQIFVKTLTGKTTITLEVEPSDTIKNVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRITLSDYN IQKKSTLHLV LRLRV^[16]。据此结果,Sal 合成酶含有 77 个氨基酸,是一个约为 10 kD 的小分子量蛋白质。且其氨基酸序列与泛素蛋白(ubiquitin)有一定相似性,只有 4 个氨基酸位点的差异。泛素 N-端的第 24 和 64 位氨基酸是谷氨酸(E),而 Sal 合成酶的相应位置均为赖氨酸(K),泛素 N-端的第 75 和 76 位氨基酸均是甘氨酸(G),Sal 合成酶的相应位置分别为缬氨酸(V)和天冬氨酸(D)。因此,本文通过对泛素基因的 4 个位点进行定点突变而获得 Sal 合成酶基因,并将其基因连接到载体 pET 30a-GST 上,表达并纯化 GST 融合蛋白,为进一步研究 Salsolinol 合成酶结构、酶学性质及其生物功能奠定基础,为阐明内源性神经毒素儿茶酚异喹啉类物质参与 PD 发病机制提供佐证。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 *E.coli*、表达载体 pET 30a-GST 和菌株 BL21(DE3)、限制性内切酶、T4DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)来源于北京华大蛋白质研发中心有限公司。其余试剂为国产分析纯。

1.2 引物设计

根据目的基因的序列及突变位点处氨基酸的密码子,设计了 3 条引物:

F1: 5'-CGGGATCCATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGAC

CGGCAGACCATCACCCCTGG-3'(下划线部分为 BamH I 酶切位点);

F2: 5'-GCAAGACCATCACCCCTGGAGGTGGAGCCCAGTGAC ACCATCAAGAACGTGAAGGCCAAG-3';

R: 3'-GGAATTCATAGTCAACCCCTCAGGCGGAGGACCAGGT GCAGGGTTGACTTTTCTGGATG-3'(下划线部分为 EcoR I 酶切位点)。

1.3 PCR 引入突变

首先以泛素基因为模板,F2 和 R 为引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为 50 μL,其中含:0.5 μL(5 unit/μL)聚合酶(*Pfu* DNA Polymerase)、3 μL dNTPs、引物各 0.2、5 μL Buffer(10 倍)、2 μL 模板 DNA、38.5 μL ddH₂O。反应条件:95℃预变性 5 min;94℃ 45 s,65℃ 45 s,72℃ 10 min,共 30 个循环;72℃ 再延伸 10 min。产物经琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,并通过琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收。

以第一轮 PCR 回收产物为模板,F1 和 R 为引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为 50 μL,其中含 0.5 μL(5 unit/μL)聚合酶(*Pfu* DNA Polymerase)、3 μL dNTPs、引物各 0.2、5 μL Buffer(10 倍)、2 μL 模板 DNA、38.5 μL ddH₂O。反应条件:95℃预变性 5 min;94℃ 45 s,65℃ 45 s,72℃ 10 min,共 30 个循环;72℃ 再延伸 10 min。产物经琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,并通过琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收。

1.4 重组质粒的构建及测序

用 BamH I 和 EcoR I 分别双酶切第二轮 PCR 扩增产物和载体 pET30a-GST,凝胶回收试剂盒回收纯化后,分别取 1 μL 载体和 3 μL PCR 扩增产物于室温连接 15 min。连接产物转化感受态大肠杆菌 BL21,接种于含卡那霉素抗性的 LB 平板上筛选阳性克隆,随机挑选 3 个菌落,转种于含卡那霉素抗性的液体培养基中,于 37℃ 培养箱中培养过夜。用快速质粒小量提取试剂盒提取质粒,并进一步双酶切筛选阳性克隆,阳性克隆菌液交由华大基因测序。

1.5 Sal 合成酶基因的诱导表达

将测序正确的阳性克隆菌液按照体积比 1:100 接种于 500 mL 含卡那霉素抗性的 LB 培养基中,于 37℃ 培养至吸光度(optical density, OD)为 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,37℃ 条件下诱导表达 4 h。取诱导的菌液,4℃ 12000 r/min 离心 10 min,沉淀用 20~30 mL 10 mmol/L Tris-HCl(pH 值 8.0)溶液吹散,在冰浴中超声破菌,收集上清,进行 12% SDA-PAGE 分析。

1.6 GST-Sal synthase 融合蛋白的纯化

质粒 pET 30a 中含有 His-tag,本研究表达的所表达的融合蛋白 N 端含 GST-tag, C 端含 His-tag 双标签。本实验采用镍柱亲和层析进行分离纯化,填料为 Ni 琼脂糖凝胶。原理是镍柱中的氯化镍可与组氨酸侧链所带有的咪唑杂环发生亲和反应结合在一起,洗脱液中含有的咪唑与蛋白竞争 Ni 的结合位点,通过不同浓度咪唑进行洗脱即可分离纯化出带有 His-tag 的目的蛋白。使用梯度浓度的咪唑纯化 Sal 合成酶

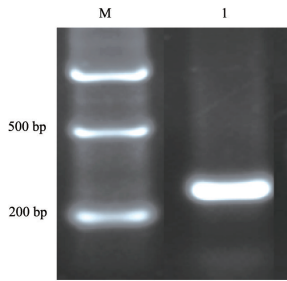
蛋白,确定Sal合成酶蛋白的洗脱所用最佳咪唑浓度后,分批大量纯化此蛋白。

2 结果

2.1 PCR扩增结果

以1%琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR扩增产物。Sal合成酶基因由231个碱基编码77个氨基酸组成,电泳结果与预期相符(图1)。

2.2 测序结果序列比对



M为DNA 标记物,1为突变产物

图1 定点突变产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis result of point mutation production

```

Query 1  ATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACCGGCAAGACCATCACCTGGAGGTGGAGCCCAGT 60
          |||
Sbjct 317 ATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACCGGCAAGACCATCACCTGGAGGTGGAGCCCAGT 258

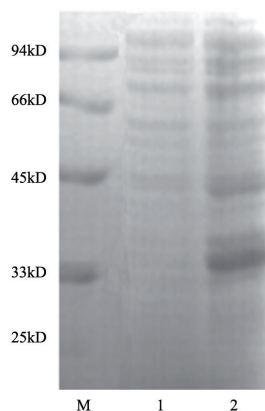
Query 61  GACACCATC GAG AACGTGAAGGCCAAGATCCAGGATAAAGAGGGCATCCCCCTGACCAG 120
          |||
Sbjct 257 GACACCATC AAG AACGTGAAGGCCAAGATCCAGGATAAAGAGGGCATCCCCCTGACCAG 198

Query 121 CAGAGGCTCATCTTTGCCGGCAAGCAGCTGGAAGATGGCCGACCCTCTCTGATTACAAC 180
          |||
Sbjct 197 CAGAGGCTGATCTTTGCCGGCAAGCAGCTAGAAGATGGCCGACTCTCTCTGATTACAAC 138

Query 181 ATCCAGAAA GAG TCAACCCTGCACCTGGTCTCCGCTGAGCGGTGGCTAT 231
          |||
Sbjct 137 ATCCAGAAA AAG TCAACCCTGCACCTGGTCTCCGCTGAGCGTTEACTAT 87
    
```

图2 Sal合成酶基因突变前后的测序结果对比

Fig. 2 Sequences of Salsolinol synthase gene before and after mutation



M为蛋白标记物,1为诱导前细菌裂解液,2为诱导后细菌裂解液

图3 表达产物SDS-PAGE电泳

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression products

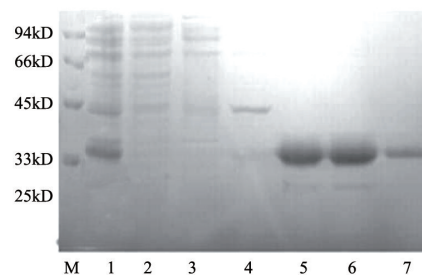
测序结果通过BLAST与泛素基因序列比对发现,70位点和190位点均由GAG(Lys, K)变为AAG(Glu, E),224位点由GGT(Val, V)变为GTT(Gly, G),227位点由GGC(Asp, D)变为GAC(Gly, G)(图2),表明在目的片段的拟突变处成功地产生了预期的突变。其他突变位点为同义突变。

2.3 GST-Sal synthase融合蛋白的诱导表达

Sal合成酶分子量约为10 kD,一般认为GST标签是大约26 kD,6个His分子量很小,可忽略。故GST-Sal synthase融合蛋白分子量约为36 kD。SDS-PAGE电泳结果显示,与IPTG诱导前菌液相对照,重组菌在分子量36 kD处增加一条目的蛋白表达区带(图3),与理论计算的GST-Sal synthase融合蛋白分子量相符。

2.4 GST-Sal synthase融合蛋白的亲和层析纯化

将IPTG诱导后的细菌进行破碎处理,提取的细菌裂解液上清直接通过镍柱亲和层析进行分离纯化,经SDS-PAGE电泳分析,考马斯亮蓝染色鉴定结果显示纯化效果较好,发现在36 kD附近呈现单一蛋白条带,与GST-Sal synthase融合蛋白的实际分子量相符,表明得到纯度较高的GST-Sal synthase融合蛋白(图4)。咪唑浓度为300 mmol/L时能看到较明显的单一条带,表明此浓度下洗脱能力最高。



M为蛋白标记物,1为表达融合蛋白裂解液,2为纯化蛋白穿柱液,3为洗脱液(15 mmol/L咪唑),4为洗脱液(60 mmol/L咪唑),5,6,7分别为1,2,3遍洗脱液(300 mmol/L咪唑)

图4 纯化的GST-Sal synthase融合蛋白的SDS-PAGE分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified GST-Sal synthase fusion protein

3 讨论

Sal合成酶是内源性神经毒素儿茶酚异喹啉类物质形成过程中的首个关键酶和限速酶,也是儿茶酚异喹啉类物质导致细胞毒性显著增加的有效激活因子。它催化DA和乙醛生成(R)-Sal,(R)-Sal能生成神经毒性更大的NM(R)-Sal,它在整个代谢过程中起决定性作用,因此它可能是PD的一种关键致病因子。基于本实验室前期对Sal合成酶的研究结果,发现其氨基酸序列与泛素序列同源性为94.8%,由此可通过泛素基因定点突变获取Sal合成酶基因。

目前,实现定点突变的方法主要是通过聚合酶链式反应(PCR),即通过设计合成含有突变碱基的引物,以待突变序列为模板进行PCR扩增,扩增产物的引物末端区段内即含有所需突变,以此实现对基因序列的定点突变。体外定点突变技术是研究基因、蛋白质结构和功能之间复杂关系的工具,也是实验室中改造或优化基因常用的手段,缺失、插入或替换特定碱基的定点突变可用不同的方法实现^[7]。本实验在同一DNA片段的两个不同部位进行联合突变,采用了两轮延伸PCR,由于目标突变氨基酸位点64、75、76位3个位点距离较近,故设计引物R同时设置3个突变碱基,引物F2引入第24位氨基酸突变。即第一轮PCR即完成4个位点的突变,第二轮PCR获得完整的Sal合成酶基因产物。

本实验设计表达含谷胱甘肽S转移酶(GST)及His双标签的融合蛋白,便于对该重组蛋白进行纯化或检测。对于分子量较大的融合蛋白,一般认为GST不会影响其结构和功能,故不需去除标签。而本实验中目标蛋白Salsolinol合成酶分子量约为10 kD,一般认为GST标签大约为26 kD,其在融合蛋白中所占比重过大,对目标蛋白的结构功能影响也很大,故在对Salsolinol合成酶酶学性质及酶活检测前需切除GST标签。

经过适当修饰的GST融合蛋白可以作为抗原制备单克隆抗体,用于融合蛋白的纯化和检测。本研究获得纯度较高的GST-Sal synthase融合蛋白,可用于单克隆抗体制备,可以检测GST-tag融合表达蛋白的表达、细胞内定位,以及纯化、定性或定量检测GST tag融合表达蛋白等。

4 结论

本研究实现了对Sal合成酶蛋白的原核表达及纯化。首先以泛素基因为模板,采用聚合酶链式反应技术对4个位点进行定点突变,测序结果表明与4个位点的突变结果与预期完全一致,成功实现目的位点的定点突变,获得了Sal合成酶基因。将突变基因片段克隆到载体pET30a-GST上,构建pET30a-GST-Sal synthase重组载体,转化BL21后IPTG诱导重组菌表达融合蛋白,经Ni柱亲和层析纯化。结果显示成功构建了GST-Sal synthase原核表达质粒,在大肠杆菌中表达纯化后得到较高纯度的GST-Sal synthase融合蛋白,为Sal合成酶蛋白功能的研究奠定基础。

参考文献(References)

- [1] Zimmermann K C, Bonzon C, Green D R. The machinery of programmed cell death[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2001, 92(1): 57-70.
- [2] Langston J W, Ballard P, Tetrud J W, et al. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis[J]. *Science*, 1983, 219(4587): 979-980.
- [3] Storch A, Kaftan A, Burkhardt K, et al. 1-Methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (salsolinol) is toxic to dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells via impairment of cellular energy metabolism[J]. *Brain Research*, 2000, 855(1): 67-75.
- [4] Sandler M, Carter S B, Hunter K R, et al. Tetrahydroisoquinoline alkaloids: *in vivo* metabolites of L-DOPA in man[J]. *Nature*, 1973, 241(5390): 439-443.
- [5] Deng Y, Maruyama W, Dostert P, et al. Determination of the (R)- and (S)-enantiomers of salsolinol and N-methylsalsolinol by use of a chiral high-performance liquid chromatographic column[J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1995, 670(1): 47-54.
- [6] Naoi M, Maruyama W, Akao Y, et al. Apoptosis induced by an endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, in dopamine neurons[J]. *Toxicology*, 2000, 153(1-3): 123-141.
- [7] Origitano H, Hannigan J, Collins M A. Rat brain salsolinol and blood-brain barrier[J]. *Brain Research*, 1981, 224(2): 446-451.
- [8] Song Y, Feng Y Z, LeBlanc M H, et al. 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline passes through the blood-brain barrier of rat brain: An *in vivo* microdialysis study[J]. *Neuroscience Letters*, 2006, 395(1): 63-66.
- [9] Deng Y, Maruyama W, Kawai M, et al. Assay for the (R)- and (S)-enantiomers of salsolinols in biological samples and foods with ion-pair high-performance liquid chromatography using 13-cyclodextrin as a chiral mobile phase additive[J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1997, 689(2): 313-320.
- [10] Musshoff F, Schmidt P, Dettmeyer R, et al. Determination of dopamine and dopamine-derived (R)-/(S)-salsolinol and norsalsolinol in various human brain areas using solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry[J]. *Forensic Science International*, 2000, 113(1-3): 359-366.
- [11] Zhu W, Wang D, Zheng J, et al. Effect of (R)-Salsolinol and N-Methyl-(R)-Salsolinol on the balance impairment between dopamine and Acetylcholine in rat brain: Involvement in pathogenesis of Parkinson disease[J]. *Clinical Chemistry*, 2008, 54(4): 705-712.
- [12] Naoi M, Maruyama W, Dostert P, et al. A novel enzyme nantio-selectively synthesizes (R) salsolinol, a precursor of a dopaminergic neurotoxin, N-methyl (R) salsolinol[J]. *Neuroscience Letters*, 1996, 212(3): 183-186.
- [13] Rojkovicova T, Mechref Y, Starkey J A, et al. Quantitative chiral analysis of salsolinol in different brain regions of rats genetically predisposed to alcoholism[J]. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science*, 2008, 863(2): 206-214.
- [14] Chen X, Arshad A, Qing H, et al. Enzymatic condensation of dopamine and acetaldehyde: A salsolinol synthase from rat brain[J]. *Bliologia*, 2011, 66(6): 1183-1188.
- [15] Chen X, Chen Y, Wu G, et al. Existence and characterization of Salsolinol synthase in neuronal cells and rat brain[J]. *Neurochemical Journal*, 2013, 7(3): 192-197.
- [16] 陈薛钗. 帕金森病相关蛋白Salsolinol合成酶的分离纯化及其酶学性质研究[D]. 北京: 北京理工大学, 2011.
Chen Xuechai. Purification and characterization of Salsolinol synthase, a Parkinson's disease related protein[D]. Beijing: Beijing Institute of Technology, 2011.
- [17] 刘彤, 李晓东, 王桂玲, 等. 一种高效而经济获得长片段基因突变体的方法[J]. *生命科学研究*, 2006, 10(1): 34-38.
Liu Tong, Li Xiaodong, Wang guiling, et al. An efficient and economic method of obtaining mutant constructs of large DNA fragment[J]. *Life Science Research*, 2006, 10(1): 34-38.

(编辑 田恬)