

蛋白质异戊二烯化关键酶 GGPPS 结合小分子筛选模型的构建

齐雅玲¹, 卢悟广², 种丹阳¹, 刘佳¹, 孙倩¹, 徐晓军³,
曹鹏², 方雷¹, 李朝军¹, 薛斌¹

(1. 南京大学医学院, 医药生物技术国家重点实验室, 江苏省医学分子技术重点实验室, 江苏 南京 210093)

(2. 江苏省中西医结合医院, 江苏 南京 210028)

(3. 中国药科大学, 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 江苏 南京 210009)

[摘要] 蛋白质的基本翻译后修饰包括磷酸化、糖基化、乙酰化、棕榈酸化等^[1], 而异戊二烯化修饰是蛋白质的基本翻译后修饰之一, 属于蛋白质的脂质修饰^[2]. 甲羟戊酸途径中的关键分支酶——香叶基香叶基焦磷酸合成酶(Geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPPS)能够催化法尼基焦磷酸盐(Farnesyl diphosphate, FPP)生成香叶基香叶基焦磷酸盐(Geranylgeranyl diphosphate, GGPP), 介导蛋白质异戊二烯化的平衡^[3]. 导致包括胰岛素抵抗^[4]、胰岛功能失调^[5]、生殖代谢异常^[6]等各种疾病的发生. GGPPS 作为调节蛋白质异戊二烯化的重要靶点, 因其在调节机体能量代谢稳态中的重要作用, 促使构建筛选模型得到靶向 GGPPS 的小分子治疗药物, 具有重要实践意义. 实现 EGFP 荧光标记 GGPPS 原核蛋白的纯化以及表达, 结合微量热泳动技术进行 GGPPS 结合天然化合物小分子的筛选模型构建. 根据筛选模型对于检测蛋白稳定荧光的要求, 分别构建含有 GGPPS 和 EGFP 基因的重组 pET28a 质粒以及对照质粒 pET28a-EGFP. 筛选高水平分泌表达 GGPPS-EGFP-His 蛋白的菌株, 并对该菌株的目的基因整合位置及拷贝数进行测序. 将含有目的基因的重组质粒的 BL-21 菌株大规模培养, 表达的目的蛋白上带有 His 标签, 利用镍(Ni)柱的亲合层析原理纯化获得重组蛋白 GGPPS-EGFP-His, 测定蛋白浓度留存. 随后基于微量热泳动技术进行小分子结合筛选. 重组 GGPPS 蛋白与梯度浓度化合物小分子在红外激光作用下发生热泳动, 通过中心区域荧光检测可得出 GGPPS 与小分子化合物的结合状况. 重组表达质粒 GGPPS-EGFP-His 经电泳及测序鉴定构建正确. 纯化获得的重组蛋白纯度约为 80%, 在微量热泳动实验中, 经 GGPPS 底物小分子法尼基焦磷酸(Farnesyl pyrophosphate, FPP)浓度梯度测试呈现良好结合. 重组蛋白 GGPPS-EGFP-His 能够在微量热泳动技术下显示与小分子底物 FPP 的结合, 该系统的构建对于筛选出 GGPPS 结合天然化合物小分子以及靶向 GGPPS 的小分子治疗药物具有重要意义.

[关键词] GGPPS 重组蛋白, 微量热泳动, 小分子筛选

[中图分类号] Q291 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2017)04-0087-06

The Construction of Mevalonate Pathway Enzyme GGPPS Protein Binding Molecules Screening Model

Qi Yaling¹, Lu Wuguang², Chong Danyang¹, Liu Jia¹, Sun Qian¹, Xu Xiaojun³,
Cao Peng², Fang Lei¹, Li Chaojun¹, Xue Bin¹

(1. State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology and Jiangsu Key Laboratory of Molecular Medicine,
School of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

(2. Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, China)

(3. State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: The post-translational modifications of proteins include phosphorylation, glycosylation, acetylation, palmitic acid and so on. And the prenylation modification of proteins is one of the basic post-translational lipid modifications of proteins. The key enzyme of mevalonate pathway, GGPPS, can catalyze FPP to generate GGPP and mediate the equilibrium

收稿日期: 2016-06-24.

基金项目: 国家自然科学基金(31371373)、江苏省自然科学基金(BK20151395)、天然药物活性组分与药效国家重点实验室开放基金(SKLNMF201606)、中央高校基本科研业务费专项资金(021414380330).

通讯联系人: 薛斌, 博士, 副教授, 研究方向: 代谢类疾病的调控机制、肝损伤再生恢复研究. E-mail: xuebin@nju.edu.cn

of protein prenylation, affect disease progression including insulin resistance, hypertension, abnormal reproductive metabolism. Hence, it has an important practical significance that construct a GGPPS interaction model to obtain its molecule therapeutic drugs. Obtain the high expression of EGFP fluorescent labeled GGPPS prokaryotic purified protein. Construct a GGPPS interaction model with microscale thermophoresis technology. The recombinant expression plasmid GGPPS-EGFP-His was constructed correctly verified by gel electrophoresis and sequencing verification. The purified recombinant protein reached a purity of about 80%. In the microscale thermophoresis assay, the GGPPS substrate farnesyl pyrophosphate concentration gradient test showed a good combination.

Key words: GGPPS recombination protein, microscale thermophoresis, small molecular screening

1 材料

1.1 质粒及菌株

pET28a 重组质粒及表达载体由上海捷瑞公司构建,目的基因插入 *Nco* I 与 *Bam*H I 酶切位点之间,克隆至 EGFP-His 基因. 大肠杆菌 BL21 来自北京全式金(Transgen Biotech)公司.

1.2 主要试剂及仪器

甲醇、乙醇、异丙醇、丙三醇、氯仿、甲醛、氨水等普通有机试剂,购自南京化学试剂公司. 二甲基亚砜、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钠、氯化钾、考马斯亮蓝 G250 染料等购自上海生工公司. 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒购自北京全式金(Transgen Biotech)公司,氯化钙、LB 培养液、甘油、诱导剂(IPTG)、镍(Ni)柱平衡缓冲液、洗杂缓冲液及洗脱缓冲液所用试剂 Tris、氯化钠、咪唑,购于美国 Sigma 试剂公司及中国索莱宝试剂公司. Ni-IDA Resin、GST-Resin、层析柱、Ni 柱亲和填料,购自江苏溥博生物科技有限公司.

2 实验方法

2.1 引物的设计与合成

在载体 pET28a 中,将目的基因 EGFP 插入 *Nco* I 与 *Bam*H I 酶切位点之间. 以反转录 cDNA 为模板,PCR 扩增 EGFP 全长野生型,扩增体系:Prime STAR Max(2×)25 μ L、20 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L、模板 150 ng、去离子水补至 50 μ L;扩增程序:98 $^{\circ}$ C 变性 10 s、55 $^{\circ}$ C 退火 15 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 5 s,35 个循环. 纯化产物用 T4 DNA 连接酶 4 $^{\circ}$ C 连接 8 h,连接产物转化 BL21 感受态,涂布卡那霉素(Kan⁺)抗性平板后 37 $^{\circ}$ C 培养 14 h,提取质粒并进行 PCR 鉴定并测序. 依据 Genebank(Gene ID:9543)中来源于人的 GGPPS 蛋白序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 GGPPS 相关引物,随后通过酶切加入 GGPPS 基因片段,连接 Linker,提取质粒并进行 PCR 鉴定并测序.

2.2 重组质粒的诱导

将测序正确的重组质粒 GGPPS-EGFP-His 转化 BL21 原核表达菌株,涂布于含卡那霉素的 LB 琼脂平板(0.5%酵母粉,1%蛋白胨,1% NaCl 及 1.5%琼脂),37 $^{\circ}$ C 培养 12 h. 挑取转化后的 BL21 菌株于 LB 试管内,37 $^{\circ}$ C,220 r/min,震荡摇菌过夜;将菌液按 1:100 接种到 1 L 含卡那霉素的 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C,220 r/min 摇菌约 3 h,使其增长在对数期(即 OD 值约为 0.5);降温至 23 $^{\circ}$ C 继续培养至 OD 600 为 0.6 左右加入终浓度 0.5 mmol/L IPTG,20 $^{\circ}$ C 诱导培养 16 h 后收集菌体. 4 $^{\circ}$ C 5 000 r/min 离心 5 min,收集菌体沉淀悬于 25 mL 裂解缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,150 mmol/L NaCl,3 mmol/L DTT),可溶性鉴定采用冰浴下超声破菌,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 30 min,收集上清,取未加诱导剂的 BL21 菌株,以及破碎后样品和离心后上清进行诱导结果检测.

2.3 蛋白免疫印迹及考马斯亮蓝染色鉴定

0.25%考马斯亮蓝 R250(100 mL):甲醇 45 mL,蒸馏水 45 mL,冰醋酸 10 mL,考马斯 0.25 g;考马斯亮蓝脱色液(1 L):乙醇 50 mL,冰醋酸 100 mL,蒸馏水 850 mL^[7].

选择加诱导剂前后的样品以及破碎后样品和离心后上清进行诱导结果的蛋白质免疫印迹(Western Blot)及考马斯亮蓝染色(Coomassie Blue Staining). 制备电泳凝胶,进行 SDS-PAGE. 电泳时间一般 4 h~5 h,首先进行 80 V 预电泳,待样品跑至分离胶改电压为 120 V,终止电泳后进行考马斯亮蓝染色. 将凝胶放入适量考马斯亮蓝染液中,确保染色液可以充分覆盖凝胶,置于水平摇床缓慢摇动,室温染色 3 h. 倒出染色

液,加入适量考马斯亮蓝脱色液,脱色过夜,拍照鉴定。

2.4 原核蛋白的表达与纯化

Ni 柱平衡缓冲液 buffer A:20 mL Tris,500 mL NaCl,20 mmol/L 咪唑,HCl 调 pH 至 8.0. Ni 柱洗杂缓冲液 buffer W:20 mmol/L Tris,500 mol/L NaCl,60 mol/L 咪唑,HCl 调 pH 至 8.0. Ni 柱洗脱缓冲液 buffer B:PBS (8.0 g NaCl;0.2 g KCl;0.24 g KH_2PO_4 ;3.63 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$),500 mol/L 咪唑,HCl 调 pH 至 8.0^[8].

将含有目的基因的重组质粒的 BL21 菌株大规模培养,表达的目的蛋白上带有 His 标签,用 ddH_2O 平衡 Ni 柱,5 mL/min,直至 280 nm、215 nm 紫外吸收值到基线水平;用 Ni 柱平衡缓冲液 buffer A,5 mL/min,平衡 Ni 柱至基线平;利用仪器的上样环上样,上样速度 2 mL/min,同时收集穿透样品,用于后续的制样跑胶,以确定是否目的蛋白都挂柱;上样结束后,用 Ni 柱洗杂缓冲液 buffer W 清洗未与 Ni 柱结合的杂蛋白,3 mL/min,至基线平,用 Ni 柱洗脱缓冲液 buffer B,3 mL/min,洗脱与 Ni 柱结合的目的蛋白,观察 280 nm 吸收峰的变化,适时在出样口处收集洗脱蛋白,上述步骤完成后用 ddH_2O 清洗 Ni 柱至基线平,然后保存于 20% 的乙醇内. 将收集的洗脱目的蛋白注入透析卡内,并将透析卡放入含有 10% 甘油的 PBS 缓冲液中,4 ℃ 放置 12 h,随后配制 1 L 的 PBS(不含甘油),透析卡放入其中,4 ℃ 放置 12 h. 制备出的原核纯化蛋白 GGPPS-EGFP-His 部分避光放置于 4 ℃ 以备后续试验,部分冻存于 -80 ℃ 长期保存。

2.5 微量热泳动实验鉴定结合

将制备出的原核纯化蛋白 GGPPS-EGFP-His 作为大分子配体,以 GGPPS 的小分子底物 FPP 作为 GGPPS 结合筛选模型的阳性检测物质. 在将试样或储备液用于微量热泳动(Microscale Thermophoresis, MST)试验前,使用离心方式进行搅拌(5 min,13 000 r/min,4 ℃). 使用 Tween 20(0.01%~0.1%)作为清除原始聚合的清洁剂^[9].

检测 GGPPS 融合荧光蛋白在 20% LED POWER 下的荧光值,使其控制在 200~1 000. 其中荧光结合蛋白的浓度不变,无标记结合配体 FPP 以稀释缓冲液 1:1 梯度稀释成 16 个浓度的滴定液. 将荧光结合蛋白与无标记结合配体按照 1:1 比例孵育 5 min,并上样至进行微量热泳动的毛细管中,随后进行试样加载及荧光数据分析。

3 结果与分析

3.1 GGPPS 基因重组质粒的鉴定

GGPPS-EGFP-His 质粒构建载体是 pET28a,以 Linker 连接目的基因 GGPPS 和绿色荧光蛋白 EGFP,插入 *Nco* I 与 *Bam*H I 酶切位点之间. 末端连接 His 标签,以便后期的蛋白纯化(图 1a),对照质粒为 pET28a-EGFP-His(图 1b)。

挑取转化后单菌落用基因特异性引物进行 PCR 鉴定(图 1c),鉴定结果显示 pET28a-EGFP-His 对照质粒及 pET28a-GGPPS-EGFP-His 融合质粒均构建正确,构建好的重组质粒载体均经测序验证,证实了序列和插入的正确(图 1d)。

3.2 GGPPS 重组蛋白纯化产物的鉴定

鉴于体外实验筛选 GGPPS 结合小分子时易出现绿色荧光染料影响结合效率的现象,这里将 EGFP 绿色荧光蛋白连接 linker 加在 GGPPS 蛋白 C 末端. 转化 BL21 菌株并以 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达,20 ℃ 诱导培养 16 h 后收集菌体,以 Ni 柱平衡缓冲液 buffer A 重悬菌株,置于冰水浴中超声破碎,离心后分别取破碎后悬浊液和上清. 进行 10% SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色、脱色后发现,GGPPS-EGFP-His 重组蛋白在上清中呈现 80% 可溶性表达. EGFP 蛋白 35 kD,与 GGPPS 融合表达 GGPPS-EGFP-His 之后总蛋白大小约为 65 kD(图 2)。

3.3 底物 FPP 在微量热泳筛选系统里与 GGPPS 重组蛋白结合

将纯化获得的 GGPPS-EGFP-His 荧光表达融合蛋白浓度保持恒定,每次滴定时所使用的滴定剂即 GGPPS 底物 FPP 浓度均有变化. 未结合 GGPPS 的热泳运动与已同 GGPPS 结合的底物 FPP 的运动不同,所示时间为 $t=30$ s 时,在不同 FPP 浓度下,GGPPS 经标准化处理后的荧光信号,以形成于 K_d 拟合的结合曲线(图 3a). 阴性对照组采用了仅表达荧光的 EGFP-His 蛋白,对照组中,未见标准化荧光随 GGPPS 浓度增加变化(图 3b)。

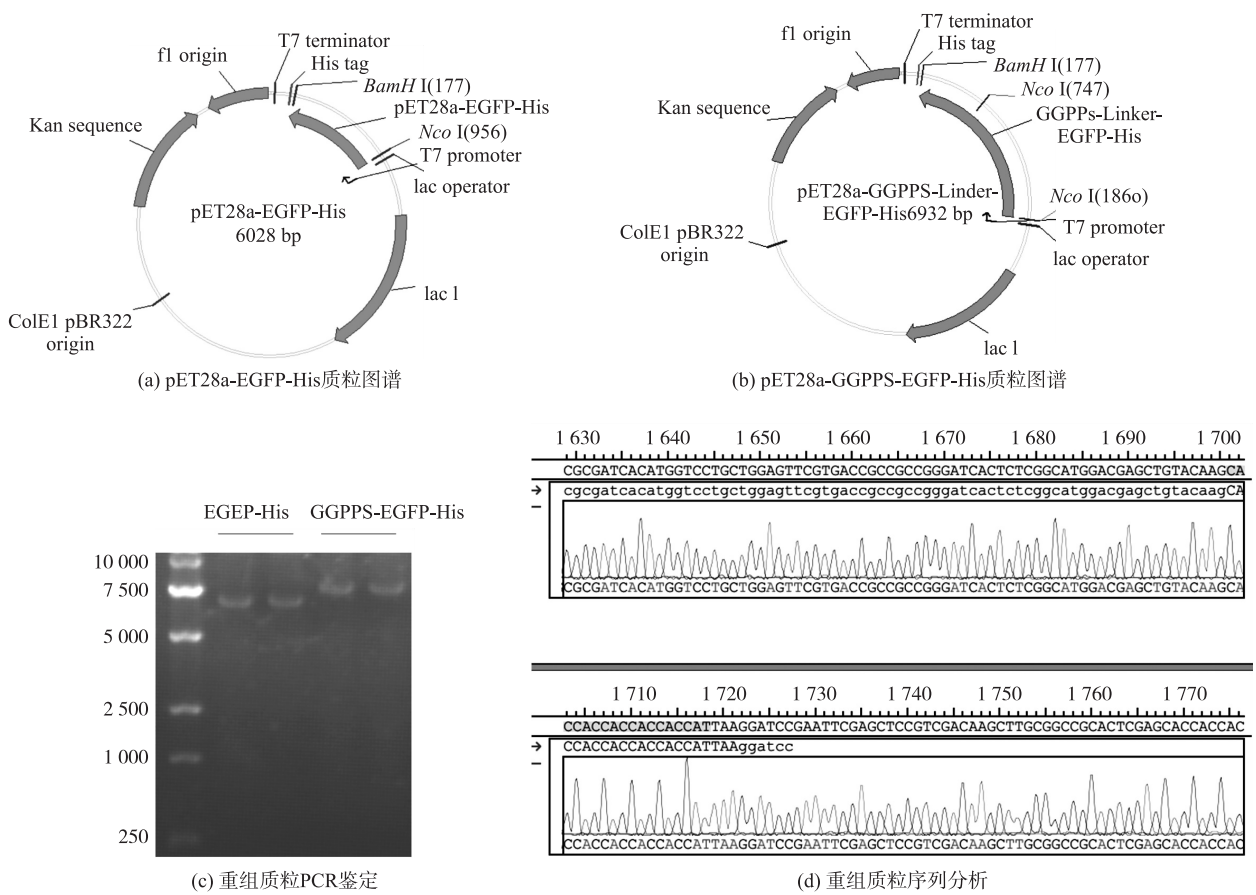


图 1 重组质粒的分析及鉴定

Fig. 1 Plasmid profile(a, b) ,PCR result(c) and sequencing verification(d) of the recombinant plasmids

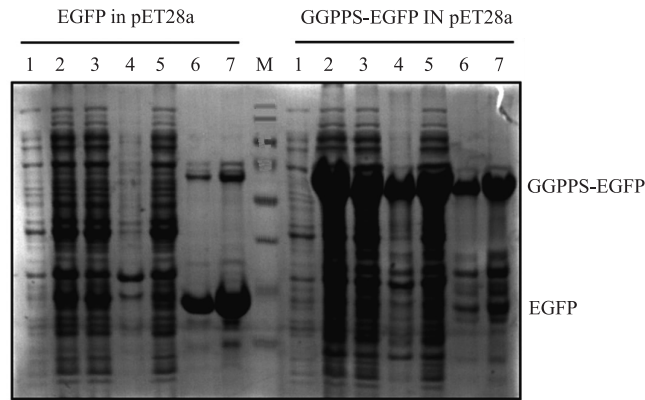


图 2 GGPPS 重组蛋白纯化产物的考马斯亮蓝色鉴定

Fig. 2 Thecoomassie blue staining identify of recombinant expression protein GGPPS-EGFP-His

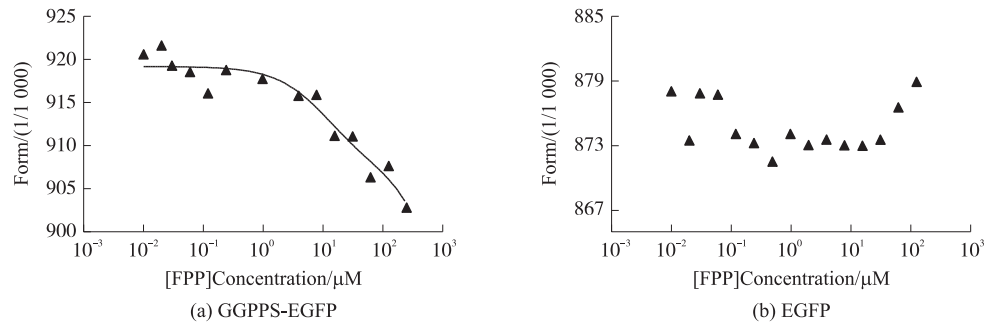


图 3 GGPPS-EGFP 纯化融合蛋白与底物 FPP 的 MST 结合鉴定

Fig. 3 Identification ofpurified fusion proteinGGPPS-EGFP-His binding with FPP by MST assay

4 讨论

蛋白质的基本翻译后修饰包括磷酸化,糖基化,乙酰化,棕榈酸化等,而异戊二烯化修饰是蛋白质的基本翻译后修饰之一,蛋白质的异戊二烯化修饰在对蛋白质的定位、结构稳定、功能的控制中起到了关键的作用。

我们长期关注蛋白质异戊二烯化失衡引发的代谢类疾病的发生机制,GGPPS 的异常表达通过改变细胞内 FPP/GGPP 的比值^[10],影响信号蛋白质的异戊二烯化修饰的平衡,导致包括胰岛素抵抗、胰岛功能失调、生殖代谢异常等各种疾病的发生。以往的研究显示,GGPPS 通过调控 MAPK/PI3K/AKT 信号通路的相对活化,参与高胰岛素状态下胰岛素抵抗的形成^[11];GGPPS 调控的蛋白质异戊二烯化修饰促进了脂肪酸诱导的肌肉胰岛素抵抗的发生^[12];GGPPS 通过调控体内 FPP/GGPP 的比例参与调控肝脏的脂质代谢。GGPPS 作为调控蛋白质异戊二烯化的关键分支酶,将成为调控能量代谢异常类疾病的重要药物靶点。

因此,我们提出 GGPPS 控制的蛋白质异戊二烯化平衡是治疗相关疾病药物靶点的观点,构建筛选模型从而得到 GGPPS 结合天然化合物小分子以及靶向 GGPPS 的小分子治疗药物将具有重要意义。

在药物筛选的工作中,通常采用拟开发药物作用的靶点设计实验,一般而言这种作用靶点是具有特定生理功能的蛋白质,如酶和受体等^[13]。候选化合物与靶点混合后,可以通过酶连免疫、荧光显色、核磁共振等方法定量测定化合物与靶点的相互作用,从而成为筛选化合物的依据^[14]。

在本文中,提出以微量热泳动的方式进行大分子靶点蛋白与化合物小分子结合鉴定。微量热泳动是一项基于物理原理近年来应用于生物分析的荧光显色定量技术^[15]。可通过测量分子在微温度梯度下的运动变化,监测分子水合壳、电性或大小的变化。可快速监测从离子或片段结合到大型蛋白质复合物在内的多种生物分子之间的相互作用^[16]。本测量方法所依据的原理是分子在“热泳动”的影响下,会沿温度梯度定向移动。局部温度差 ΔT 可引起分子浓度的局部变化(耗减或增加),并随后进行量化表征^[17]。由于缓冲剂保持不变,因此热泳动耗减或增加的变化仅可能是由于荧光分子的大小、电荷或溶解熵的变化造成。当滴定后的非荧光分子与带标记的分子发生结合时,以上各特性至少有一种会发生变化,通过测定热泳动变化,即可对目标蛋白质和特定化合物小分子结合情况进行量化^[18]。

传统的微量热泳动实验采用绿色荧光染料对待测缓冲体系中的蛋白质大分子进行染色^[19],通过滴定后的非荧光分子与带标记的分子发生结合后的变化进行量化。但是这种方式的缺点是荧光染料与待测大分子的结合不稳定,容易造成检测误差。在本实验中,根据筛选模型对于检测蛋白稳定荧光的要求^[20],我们直接构建绿色荧光蛋白与目标靶蛋白的融合表达蛋白。分别构建含有 GGPPS 和 EGFP 基因的重组 pET28a 质粒以及对照质粒 EGFP。重组 GGPPS 蛋白与梯度浓度化合物小分子在红外激光作用下发生热泳动,通过中心区域荧光检测可得出 GGPPS 与小分子化合物的结合状况。

原核重组纯化蛋白 GGPPS-EGFP-His 能够在微量热泳动技术下显示与小分子底物 FPP 的结合,该系统的构建对于筛选出 GGPPS 结合天然化合物小分子以及靶向 GGPPS 的小分子治疗药物具有重要意义。

[参考文献]

- [1] KONSTANTINOPOULOS P A, KARAMOUZIS M V, PAPAVALASSILIOU A G. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(7): 541-555.
- [2] BERNDT N, HAMILTON A D, SEBTI S M. Targeting protein prenylation for cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(11): 775-791.
- [3] MARSHALL C. Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions[J]. *Science*, 1993, 259(5 103): 1 865-1 867.
- [4] SHEN N, YU X, PAN F Y, et al. An early response transcription factor, Egr-1, enhances insulin resistance in type 2 diabetes with chronic hyperinsulinism[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(16): 14 508-14 515.
- [5] JIANG S, SHEN D, JIA W J, et al. GGPPS-mediated Rab27A geranylgeranylation regulates β cell dysfunction during type 2 diabetes development by affecting insulin granule docked pool formation[J]. *The journal of pathology*, 2016, 238(1): 109-119.
- [6] WANG X X, YING P, DIAO F, et al. Altered protein prenylation in Sertoli cells is associated with adult infertility resulting from childhood mumps infection[J]. *Journal of experimental medicine*, 2013, 210(8): 1 559-1 574.

- [7] 王孝平,邢树礼. 考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究[J]. 天津化工,2009(3):40-42.
- [8] 蒋世强,潘能庆,鄢航,等. 重组蛋白纯化研究进展[J]. 现代农业科技,2017(4):250-251,254.
- [9] JERABEK W M, WIENKEN C J, BRAUN D, et al. Molecular interaction studies using microscale thermophoresis[J]. Assay and drug development technologies,2011,9(4):342-353.
- [10] GISSELBERG J E, ZHANG L, ELIAS J E, et al. The prenylated proteome of Plasmodium falciparum reveals pathogen-specific prenylation activity and drug mechanism-of-action[J]. Molecular and cellular proteomics,2017,16(4 suppl 1):S54-S64.
- [11] SHEN N, JIANG S, LU J M, et al. The constitutive activation of Egr-1/C/EBP α mediates the development of type 2 diabetes mellitus by enhancing hepatic gluconeogenesis[J]. The American journal of pathology,2015,185(2):513-523.
- [12] TAO W, WU J, XIE B X, et al. Lipid-induced muscle insulin resistance is mediated by GGPPS via modulation of the RhoA/Rho kinase signaling pathway[J]. Journal of biological chemistry,2015,290(33):20 086-20 097.
- [13] BAJUSZ D, FERENCZY G G, KESERU G M. Structure-based virtual screening approaches in kinase-directed drug discovery[J]. Current topics in medicinal chemistry,2017,17(20):2 235-2 259.
- [14] COHEN K E. System and method for drug screening and monitoring pupil reactivity and voluntary and involuntary eye muscle function[J]. Google patents,2016.
- [15] BREITSPRECHER D, SCHLINCK N, WITTE D, et al. Aptamer binding studies using micro scale thermophoresis[J]. Nucleic acid aptamers:selection, characterization, and application,2016:99-111. DOI:10.1007/978-1-4939-3197-2-8.
- [16] ENTZIAN C, SCHUBERT T. Studying small molecule-aptamer interactions using MicroScale Thermophoresis (MST) [J]. Methods,2016,97:27-34.
- [17] SEIDEL S A, WIENKEN C J, GEISLER S, et al. Label-free microscale thermophoresis discriminates sites and affinity of protein-ligand binding[J]. Angewandte chemie international edition,2012,51(42):10 656-10 659.
- [18] KHAVRUTSKII L, YEH J, TIMDFEEVA O, et al. Protein purification-free method of binding affinity determination by microscale thermophoresis[J]. Journal of visualized experiments,2013(78):e50541-e50541.
- [19] JERABEK W M, ANORE T, WANNER R, et al. MicroScale thermophoresis:interaction analysis and beyond[J]. Journal of molecular structure,2014,1077:101-113.
- [20] CARRARA M, PRISCHI F, NOWAK P R, et al. Noncanonical binding of BiP ATPase domain to Ire1 and Perk is dissociated by unfolded protein CH1 to initiate ER stress signaling[J]. Elife,2015(4):e03522.

[责任编辑:黄 敏]