

文章编号:0253-2778(2014)11-0943-09

人类隐花色素蛋白(*Homo sapiens* Cryptochrome, HsCRY)昆虫表达系统的建立及其与 FAD 结合状态的 NMR 研究

王晓明, 王嘉榕, 李 燕, 王玉娟

(中国科学院合肥物质科学研究院, 强磁场科学中心, 安徽合肥 230031)

摘要:隐花色素(Cryptochrome, CRY)蛋白是一种对蓝光敏感的蛋白,它与辅因子黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)形成的自由基电子对在调节生物钟及感应磁场中发挥重要的作用,但目前对人类 CRY(*Homo sapiens* CRY, HsCRY)蛋白的结构功能研究尚未见报道.以 HeLa 细胞 RNA 为模板,通过 RT-PCR 方法扩增得到全长 1 761 bp 的 HsCRY1 基因,将其克隆到 HTA 杆状病毒转座载体上,经菌落 PCR 和测序鉴定出阳性重组转座载体 HTA-HsCRY1,转化含有病毒杆粒 bacmid 的 DH10Bac 感受态细胞,蓝白斑筛选和 PCR 检测获得重组质粒 Bacmid-HsCRY1,转染昆虫 *Spodoptera frugiperda*(sf9)细胞,产生的病毒感染昆虫细胞获得分子量为 66kDa 的目的蛋白 HsCRY1.蛋白经 Western Blot 和 SDS-PAGE 鉴定,并利用镍亲和层析柱纯化,结果 100 mmol/L 及 200 mmol/L 咪唑均可洗脱下较纯的目标蛋白.同源蛋白的多序列比对表明 HsCRY1 的 W320, W374 以及 W397 可能组成传递电子的色氨酸三联体,对 3 个突变蛋白 W320F, W374F 以及 W397F 进行表达纯化.³¹P 核磁共振检测蛋白与辅因子 FAD 的结合状态,发现与自由态 FAD 的磷谱相比,野生型 HsCRY1 及突变体 3(W397F)结合的 FAD 的化学位移发生了改变,而 HsCRY1 突变体 1(W320F)以及突变体 2(W374F)不结合 FAD.本实验成功构建了表达 HsCRY1 蛋白及其色氨酸突变蛋白的杆状病毒-昆虫表达系统,并通过核磁共振的方法发现色氨酸突变位点会对蛋白与 FAD 的结合产生影响.

关键词:人类隐花色素(CRY)蛋白;突变蛋白;黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD);杆状病毒-昆虫表达系统
中图分类号:Q6-3 **文献标识码:**A doi:10.3969/j.issn.0253-2778.2014.11.009

引用格式: Wang Xiaoming, Wang Jiarong, Li Yan, et al. Expression of HsCRY in insect cells and research into its binding state with FAD by NMR[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2014, 44(11): 943-951.

王晓明, 王嘉榕, 李燕, 等. 人类隐花色素蛋白(*Homo sapiens* Cryptochrome, HsCRY)昆虫表达系统的建立及其与 FAD 结合状态的 NMR 研究[J]. 中国科学技术大学学报, 2014, 44(11): 943-951.

Expression of HsCRY in insect cells and research into its binding state with FAD by NMR

WANG Xiaoming, WANG Jiarong, LI Yan, WANG Yujuan

(High Magnetic Field Laboratory, Hefei Institute of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract: Cryptochrome (CRY) is a kind of protein sensitive to blue light, and the radical pair formed

收稿日期:2014-04-16;修回日期:2014-05-05

基金项目:国家自然科学基金青年基金(31200579)资助.

作者简介:王晓明,女,1988年生,硕士.研究方向:生物大分子的结构功能. E-mail: bdzxx0610@163.com

通讯作者:王玉娟,博士/副研究员. E-mail: yjwang@hml.ac.cn

between the conserved tryptophan triad and cofactor flavin adenine dinucleotide (FAD) plays a central role in mediating circadian clock and magnetoreception. The full-length 1 761 bp DNA of *HsCRY1* was cloned from HeLa cell using RT-PCR. Eukaryotic expression vector HTA-*HsCRY1* was constructed and verified through colony PCR and sequencing, and it was then transformed into DH10Bac to obtain recombinant bacmid. Bacmid-*HsCRY1* was obtained through picking white colonies and PCR analysis. Insect Sf9 cells were transfected by Bacmid-*HsCRY1* to produce target protein. CRY was analyzed by Western Blot and purified by nickel affinity chromatography with 100 mmol/L and 200 mmol/L imidazole. Three conserved Trp related to electron transfer were predicted by alignment of CRY homologies, and the mutants were also expressed through Bac-Bac baculovirus expression system. The binding state between protein and cofactor flavin adenine dinucleotide was detected by ^{31}P NMR. Compared with the ^{31}P spectrum of free FAD, the chemical shift change of FAD binding with *HsCRY1* and mutant3 (W397) was observed, while no chemical shift was observed for FAD binding with mutant1(W320) and mutant2(W374). These results demonstrate that *HsCRY1* and its mutants are successfully expressed through Bac-Bac baculovirus expression system, and that mutation affects the binding state of FAD with protein.

Key words: Homo sapiens Cryptochrome (*HsCRY*); mutant; flavin adenine dinucleotide (FAD); Bac-Bac baculovirus expression system

0 引言

生物钟普遍存在于各种物种中,对生物的激素代谢行为和活动都具有重要的调节作用.生物钟通路受光照的诱导,光照一方面通过外在光感受器诱导昆虫生物钟通路,另一方面通过光受体——隐花色素(Cryptochrome, CRY)诱导生物钟信号通路. CRY 蛋白是一种对蓝光敏感的蛋白,属于具有 DNA 修复功能的光裂解酶家族^[1-2]. 该蛋白在不同的种属中结构保守, N 端都有保守的 PHR 结构域,由 α/β 结构域以及 α 螺旋组成,辅因子黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)位于 PHR 结构域的一个结合口袋中^[3]. FAD 由烷基连接异咯嗪环以及腺嘌呤组成,异咯嗪环中的 N10 及 N5 原子与蛋白 α 14 螺旋上的精氨酸 Arg 会产生极化作用^[4]. 不同种属的 CRY 蛋白 C 端结构域结构及功能差异较大,如果蝇 CRY 的 C 端结构域可以保护蛋白不与泛素 E3 连接酶 JETLAG 结合从而稳定蛋白结构,而拟南芥 CRY 与底物的相互作用需要完整的 C 端结构域^[5-7].

当蓝光照射时, PHR 结构域中 3 个保守的色氨酸 Trp 形成的色氨酸三联体会发生电子传递,将电子从蛋白表面的 TrpC 传至包埋在蛋白内部的 TrpA,进而传递至 FADox,形成自旋相关自由基电子对 $[\text{FAD}^{\cdot-} + \text{TrpC}^{\cdot}]$,这一过程伴随着 FAD 质子化以及 TrpC 去质子化,进而形成 $[\text{FADH}^{\cdot} +$

$\text{TrpC}^{\cdot}]$,随后会发生电子回传现象,并且只有处于单线态时电子才能由半醌态 FAD 转移至 TrpC^{\cdot} ^[8-9]. 自由基电子对的形成对于 CRY 蛋白调节生物钟至关重要.

目前在蛋白质数据库(protein data bank, PDB)中的 40 多种 CRY 蛋白中,只有 3 个蛋白的结构已提交数据库.唯一结构完整的是果蝇 CRY 蛋白的晶体结构^[10],此外还有小鼠 CRY 蛋白的 PHR 结构域,小鼠 CRY2 蛋白与 FBXL3-SKP1 复合物结构^[11].另外,有研究者通过突变的方法检测到了传递电子的色氨酸三联体,如非洲爪蟾(*Xenopus*) CRY DASH^[12].尽管在很多种属中,CRY 蛋白的结构功能研究取得了一定的进展,但这些研究多集中于少数几个物种,如拟南芥、果蝇等方面,关于人类 CRY 蛋白的结构功能研究仍未见报道.因而人类 CRY 基因的克隆、蛋白的表达及其传递电子的色氨酸三联体的检测对于蛋白结构的解析、功能的研究具有重要意义.本文通过杆状病毒-昆虫表达系统表达了人类隐花色素蛋白及其色氨酸突变蛋白,并通过核磁共振的方法检测蛋白与辅因子 FAD 的结合状态,为后续探索人类生物钟信号通路及磁场感应打下了坚实的基础.

1 材料与amp;方法

1.1 材料

HeLa 细胞、Sf9 昆虫细胞为本实验室保存细胞

株;感受态细胞 DH10Bac、载体 HTA、转染试剂 Mix Cellfectin® Reagent、培养基 Sf-900 II SFM 和 Grace's Medium 购自 Invitrogen 公司;一抗抗 Histag 抗体及二抗抗兔抗体购自 CST 公司;镍柱 Hitrap Ni²⁺-chelating 购自 GE 公司. TIANGEN 总 RNA 提取试剂盒、Takara cDNA 逆转录试剂盒、DNA 小量回收试剂盒、限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 购自上海生工公司.

1.2 目的基因 HsCRY1 的获得

1.2.1 RNA 提取

收集人类 HeLa 细胞于 15 mL 离心管中,离心,倒掉悬浮液. 轻弹离心管底部,使细胞松散. 用 TIANGEN 总 RNA 提取试剂盒提取 RNA, -80 °C 保存备用. 琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计检测 RNA 纯度.

1.2.2 HsCRY1 cDNA 合成

采用 Takara cDNA 逆转录试剂盒合成 HsCRY1 的 cDNA 第一条链. 反应体系及条件如下: 4 μ L RNA, 1 μ L Oligo(dt) 18 primer, 7 μ L RNase Free ddH₂O, 65 °C 放置 5 min, 冰上存放, 加入 4 μ L 5 \times Reaction buffer, 1 μ L Ribolock RNase Inhibitor, 2 μ L 10 mmol/L dNTP mix, 1 μ L reverted M-MnLV Reverse transcriptase. 混匀, 42 °C 放置 60 min, 70 °C 放置 5 min, 即可得到 cDNA, 保存于 -20 °C.

1.2.3 PCR 扩增目的基因

以上述 cDNA 的第一条链为模板, 进行 PCR 扩增. 所使用的两条引物的序列分别为 P1: 5'-ATATATGGATCCGATGGGGGTGAACGCCGTGCA-3', P2: 5'-CGCATCCTCGAGCTAATTAGTGCTCTGTCTCTGGACTTTAGGACCA-3'. 在它们的两端分别含有限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 的酶切位点. PCR 反应条件: 94 °C, 5 min; 60 °C, 30 s; 72 °C, 2 min, 循环次数为 35 次. 琼脂糖电泳检测, PCR 产物纯化试剂盒进行回收并将产物送交生工公司测序.

1.3 HsCRY1 昆虫表达载体构建

HTA 载体与 HsCRY1 基因的 DNA 片段用限制性内切酶双酶切, 以获得两端分别为 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切产生的粘性末端的 HTA 载体和 HsCRY1 基因的 DNA 片段. 分别用琼脂糖电泳分离纯化, 紫外灯下切割含有 HTA 及 HsCRY1 基因目标片段的区域, DNA 小量回收试剂盒回收目标

片段. 琼脂糖电泳结果估测载体和目的基因含量, 将目的基因片段与载体按照物质的量比约 3:1 的比例进行混合, TaKaRa 连接试剂盒于 16 °C 恒温连接 2 h. 连接产物转化 DH5a 感受态细胞, 挑选转化菌株进行菌落 PCR 检测并送交生工公司测序.

1.4 转座重组及 PCR 法检测病毒杆粒 bacmid

取测序正确的 1 ng HTA-CRY 重组质粒加入至 100 μ L DH10Bac 的感受态细胞中, 冰上孵育 30 min, 42 °C 热激 45 s, 冰上孵育 2 min, 加入 900 μ L S. O. C 培养基, 37 °C 震荡 4 h. 用 S. O. C 培养基将细胞稀释为原浓度的 1/10, 1/100, 1/1 000, 取稀释后的溶液 100 μ L 分别涂于含有 50 mg/L 卡那霉素、7 mg/L 庆大霉素、10 mg/L 四环素、100 mg/L *Bluo*-gal 以及 40 mg/L IPTG 的 LB 平板中, 37 °C 培养 48 h. 取平板上的 10 个白色单克隆, 接种于含有 50 mg/L 卡那霉素、7 mg/L 庆大霉素、10 mg/L 四环素、100 mg/L *Bluo*-gal 以及 40 mg/L IPTG 的 LB 培养基中, 37 °C 过夜培养. 异丙醇沉淀法提取病毒杆粒 bacmid, 并用 PCR 法检测病毒杆粒 bacmid. 所使用的两条引物序列分别为

P+: 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3',

P-: 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3'

PCR 反应条件: 94 °C, 3 min; 94 °C, 45 s; 55 °C, 45 s; 72 °C, 5 min, 循环次数为 35 次, 72 °C, 7 min. 琼脂糖凝胶电泳法检测 PCR 产物.

1.5 重组杆状病毒的包装、扩增

1.5.1 P1 代病毒的产生

① 确保昆虫细胞 sf9 处于对数生长期 (1.5~2.5 \times 10⁶) 并且细胞有 95% 以上的存活率.

② 用 Grace's Medium 稀释 sf9 细胞, 保证六孔板中每孔有 2 mL 细胞, 且细胞数目为 8 \times 10⁵, 室温静置 15 min, 使细胞贴壁.

③ 将 8 μ L 转染试剂 Mix Cellfectin® Reagent 用 100 μ L Grace's Medium 稀释, 室温放置 30 min, 1 μ L 病毒杆粒 bacmid 用 100 μ L Grace's Medium 稀释, 将二者混匀, 室温放置 15~30 min.

④ 将上述 DNA-lipid 混合物逐滴加入至六孔板中的细胞液中, 阴性对照为不添加 DNA-lipid 混合物的昆虫细胞, 27 °C 培养 3~5 h.

⑤ 移除培养基加入 2 mL 完全培养基 Sf-900 II SFM, 27 °C 培养至看到病毒感染现象后将细胞收集于 15 mL 离心管中, 500 g 离心 5 min 移除细胞及碎片.

⑥ 将上清转移至无菌管中即得到 P1 代病毒, 用 $0.2 \mu\text{m}$ 滤器过滤, 加入小牛血清至终浓度为 2%, 避光保存于 4°C .

1.5.2 扩增 P1 代病毒

将处于对数生长期 ($1.5 \sim 2.5 \times 10^6$) 并且有 95% 以上存活率的昆虫细胞铺于六孔板中, 取合适滴度的 P1 代病毒感染细胞, 27°C 培养 3 d. 将细胞收集于 15 mL 离心管中, 500 g 离心 5 min 移除细胞及碎片. 将上清转移至无菌管中即得到 P2 代病毒, 用 $0.2 \mu\text{m}$ 滤器过滤, 加入小牛血清至终浓度为 2%, 避光保存于 4°C . 用同样的方法对 P2 代病毒进行扩增, 得到 P3 代病毒.

1.6 重组蛋白的表达及纯化

① 用无菌 250 mL 的三角瓶在摇床上振荡培养 50 mL 悬浮昆虫细胞, 确保昆虫细胞处于对数生长期 ($1.5 \sim 2.5 \times 10^6$) 并且细胞有 95% 以上的存活率.

② 向细胞中接种 $500 \mu\text{L}$ P3 代病毒, 27°C 振荡培养 3 d.

③ 收集细胞, 8000 r/min , 5 min 离心收集沉淀. 加入 10 mL 结合缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Triton X-100, pH 7.2) 重悬菌体, 在冰浴条件下, 超声波破碎菌体细胞, 超 3 s 停 4 s, 2 min, 功率为 20%. 4°C , 12000 r/min 离心 30 min, 回收上清并取 $10 \mu\text{L}$ 进行 Western Blot 检测. 所用一抗为抗 Histag 抗体. 剩余上清与镍柱 Hitrap Ni^{2+} -chelating 结合. 分别用 30 mL 结合缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.1% TritonX100, pH7.2) 及 2 mL 含有 40, 80, 100, 200 mmol/L 咪唑的结合缓冲液洗脱蛋白, 分管收集. 获得的蛋白质通过 SDS-PAGE 检测. 透析去除咪唑, 蛋白保存于 -20°C .

1.7 蛋白的多序列比对

在 NCBI 中选取 6 个不同种属的 CRY 蛋白与本实验得到的 *Homo sapiens* CRY1 (NP_004066.1) 进行 ClustalX 多序列比对, 同源序列分别为 *Drosophila melanogaster* (AAF55649.1), *Homo sapiens* CRY2-1 (NP_066940.2), *Homo sapiens* CRY2-2 (NP_001120929.1), *Mus musculus* CRY1 (NP_031797.1), *Xenopus laevis* DASH (NP_001084438.1), *Arabidopsis thaliana* CRY3 (PDB:2IJG_X).

已有文献报道了果蝇 CRY 蛋白中的色氨酸三

联体为 W342, W397 以及 W420, 以此为标准通过序列比对找出 HsCRY1 蛋白中的 3 个保守色氨酸为 W320, W374 以及 W397.

1.8 HsCRY1 色氨酸突变体蛋白的表达及检测

根据突变位点分别对 HsCRY1 蛋白进行点突变, 应用杆状病毒-昆虫表达系统表达突变蛋白. 首先构建 W320F, W374F 以及 W397F 的 HTA-CRY 病毒质粒, 转化 DH10Bac 进行转座重组, 再通过转染昆虫细胞产生 3 代病毒, 最后进行突变体蛋白的表达纯化并用 Western Blot 及 SDS-PAGE 检测.

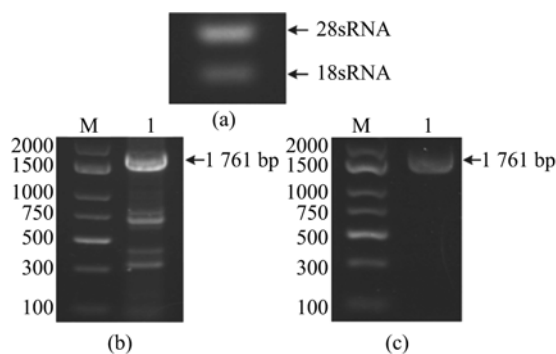
1.9 HsCRY1 蛋白及其突变体的 ^{31}P 核磁共振实验数据采集和处理

将蛋白浓缩为 0.1 mmol/L , 补入重水至终浓度为 10% (体积分数). 在配有超低温探头的 Bruker Avance 850MHz 谱仪上采集 ^{31}P 核磁共振谱图, 谱宽为 40.048 9, 累加次数为 5 120, 记谱温度为 298 K.

2 结果与分析

2.1 HsCRY1 总 RNA 提取及目的基因的扩增

使用 QIAGEN 试剂盒提取的总 RNA 经紫外分光光度计及电泳检测, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.9$, 纯度和质量符合要求 (图 1(a)). 以合成的 cDNA 第一条链为模板, 经 PCR 对目的基因扩增, 电泳检测如图 1(b). 结果显示, 除了目的基因 1 761 bp 的条带外, 还存在非特异性扩增的杂带. 对目的条带进行切胶回收, 再次进行 PCR 扩增, 得到单一且大小正确的目的基因片段 (图 1(c)).



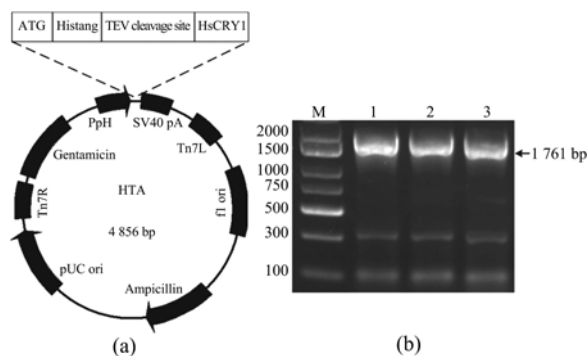
(a) Isolation of total RNA;
(b) Amplification of the first strand of cDNA;
(c) Amplification of target gene. M: Marker; 1: HsCRY1 gene

图 1 总 RNA 的提取及目的基因的扩增

Fig. 1 Isolation of total RNA and Amplification of target gene

2.2 重组载体菌落 PCR 检测

HTA 质粒与 PCR 产物 HsCRY1 的 DNA 片段分别进行双酶切并连接转化后,进行菌落 PCR 检测,即挑选 3 个转化菌落为模板进行 PCR 扩增,电泳检测 PCR 产物大小,结果获得了合适大小的条带(图 2(b)),将此菌落的过夜菌液送交测序,结果正确,说明 HsCRY1 基因成功地插入至 HTA 载体中,形成了重组病毒质粒 HTA-HsCRY1。



(a) Plasmid map of HTA-HsCRY1; (b) PCR analysis.

M: Marker; 1-3: PCR verification of transformants

图 2 重组载体菌落 PCR 检测

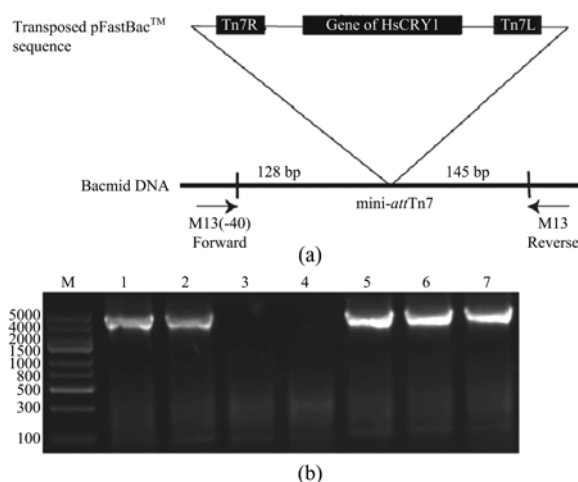
Fig. 2 Colony PCR analysis of recombinant vector

2.3 PCR 法检测重组病毒杆粒 bacmid

HTA-HsCRY1 重组质粒转化 DH10Bac 后,通过蓝白斑筛选法选出白斑菌落,提取病毒杆粒并用 PCR 方法进行检测.由于 PCR 所用的引物为 DH10Bac 感受态细胞内源病毒杆粒 bacmid DNA 上的一段序列,如果外源目的基因 HsCRY1 转座于病毒杆粒上,则可通过 PCR 的方法扩增出一段含有 HsCRY1 (1 761 bp) 及病毒杆粒某段基因 (2 430 bp) 的 DNA 序列,总大小为 2 430 bp + 1 761 bp = 4 191 bp(图 3)。

2.4 重组蛋白的表达及纯化

将扩增的 P3 代病毒转染昆虫细胞,经超声破碎后收集上清进行 Western Blot 检测,发现有合适大小 66 kDa 左右的条带(图 4(b)). 条带 1 为含有 His-tag 蛋白的阳性对照,条带 2 为阴性对照即不加病毒的昆虫细胞,条带 3 为加 P3 代病毒的昆虫细胞.经镍柱纯化后发现 100 mmol/L 及 200 mmol/L 咪唑洗脱下了目的蛋白(图 4(c)),表明 HsCRY1 基因在昆虫细胞中得到了过量表达.将目的蛋白收集,50 mL 细胞得到了 4.8 mg 蛋白,蛋白的表达量为 96 mg/L。



(a) HsCRY1 transposed into bacmid DNA; (b) PCR analysis.

M: Marker; 1-7: PCR verification of recombinant bacmid

图 3 重组病毒杆粒 bacmid PCR 检测

Fig. 3 PCR analysis of recombinant bacmid

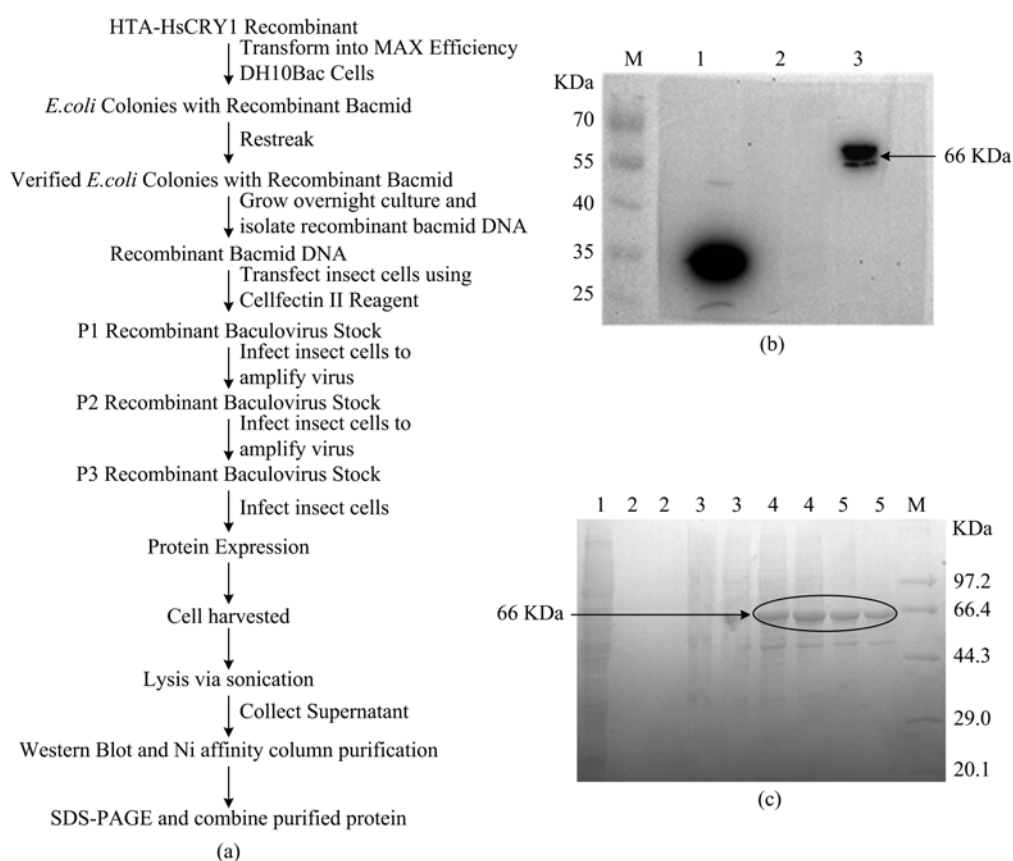
2.5 HsCRY1 色氨酸突变体的表达及检测

已有文献报道了果蝇 CRY 蛋白中的色氨酸三联体为 W342, W397 以及 W420,同源序列的多序列比对表明, HsCRY1 的 W320, W374 以及 W397 3 个色氨酸可能是与电子传递相关的氨基酸(图 5)。

通过点突变的方法将其突变为苯丙氨酸后,经上述杆状病毒转染法转染昆虫细胞,得到过表达相应突变蛋白的细胞,同上进行表达破碎后,上清经 Western Blot 检测并纯化蛋白,结果如图 6. HsCRY1 突变体 1(W320F)蛋白表达量为 90 mg/L,突变体 2(W374F)蛋白表达量为 94 mg/L,突变体 3(W397F)蛋白表达量为 93 mg/L。

2.6 ^{31}P 谱检测 HsCRY1 蛋白及其色氨酸突变体与 FAD 的结合状态

辅因子 FAD 含有磷原子,而 HsCRY1 蛋白及其色氨酸突变体不含磷原子,因而可通过检测是否有 ^{31}P 的信号来确定蛋白与 FAD 的结合状况.如图 7 所示,与自由态 FAD 的磷谱相比,野生型 HsCRY1 及突变体 3(W397F)结合的 FAD 的化学位移发生了改变,说明结合了蛋白的 FAD 构象发生了变化,或者其磷原子与蛋白氨基酸的某些原子发生了相互作用.并且与野生型蛋白相比,突变 3 的磷谱信号变弱,说明突变 W397 降低了蛋白与 FAD 的结合能力.而 HsCRY1 突变体 1(W320F)以及突变体 2(W374F)的磷谱显示无 ^{31}P 信号,表明 FAD 不与这两个突变蛋白结合,即纯化出的蛋白不含有辅因子 FAD.以上结果说明突变影响了辅因子



(a) Flowchart for HsCRY1 expression and purification; (b) Western Blot. M, Marker; 1: positive control; 2: negative control; 3: HsCRY1; (c) 12% SDS-PAGE showing protein expression and purification by nickel affinity chromatography. M, regular protein molecular weight marker; lane 1, flow through from the Hitrap Ni²⁺-chelating; lanes 2-5, elutions with the 40, 80, 100 and 200 mM imidazole gradient

图 4 HsCRY1 蛋白的表达纯化

Fig. 4 Expression and purification of HsCRY1

FAD 与蛋白的结合.

3 讨论

原核表达系统存在缺少翻译后修饰以及蛋白表达为包涵体等缺陷,因而强大的真核表达系统受到了越来越广泛的关注.杆状病毒-昆虫表达系统是通过将外源目的基因插入至病毒质粒中,获得重组病毒杆粒再转染昆虫细胞而对某个蛋白或蛋白复合物进行表达的真核表达系统.外源蛋白可在该系统内进行二硫键的配对、构象的折叠以及糖基化、磷酸化、酰基化等完整的翻译后修饰,从而使外源蛋白在结构和功能上与天然蛋白相似度极高.杆状病毒的毒粒具有较好的柔韧性,可以容纳较大的外源基因,并且可以同时表达多种基因,从而实现了异源二聚体或多聚体的表达.另外,由于病毒的 DNA 不能在

人体内进行增殖,因而不存在感染人体的安全隐患.由于该系统具有翻译后修饰、基因容量大、安全性高等特点,其在结构生物学等领域中的应用日趋广泛.自 1983 年第一次利用杆状病毒-昆虫表达系统合成干扰素^[13]后,该系统已成功表达了多种外源蛋白,如酿酒酵母转录中介复合体头部模块的结构^[14]以及人转录因子 TFIID 核心支架复合体的结构^[15]等.本实验在采用杆状病毒-昆虫表达系统前,曾尝试大肠杆菌(*Escherichia coli*)原核表达系统,结果 CRY 蛋白表达为不可溶形式的包涵体,之后我们又将蛋白与可溶性标签麦芽糖结合蛋白 MBP 进行融合,在大肠杆菌中表达,虽然融合蛋白表达可溶,但在切去标签的过程中出现了酶切不完全的现象.因而相对于原核表达系统,昆虫表达系统具有不可比拟的优势,采用该系统成功表达了 CRY 蛋白,且蛋白为

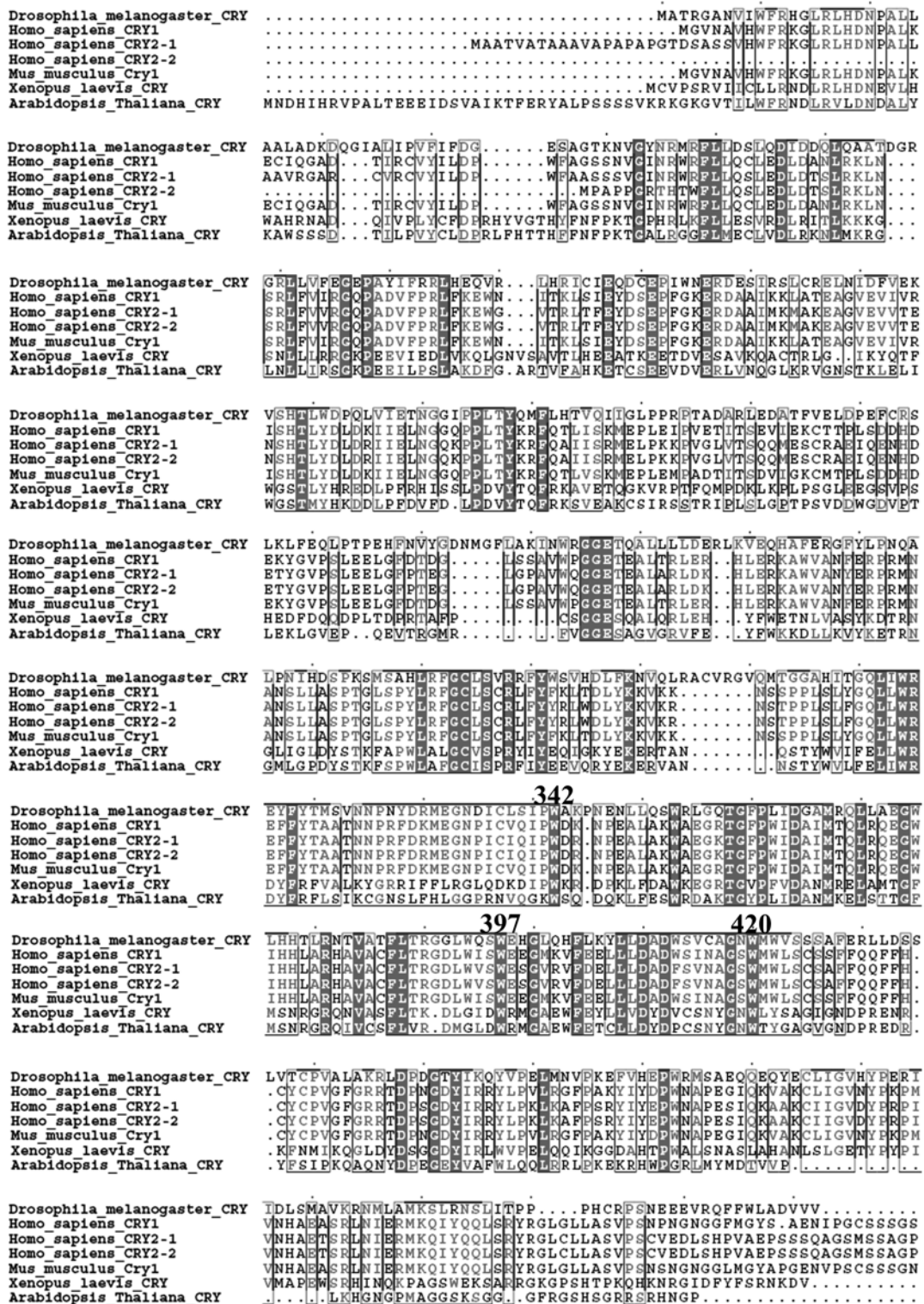
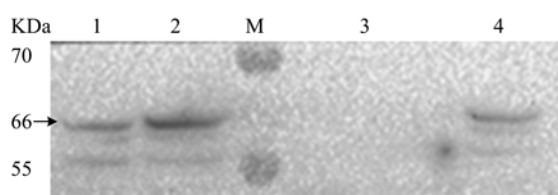


图 5 CRY 同源蛋白的序列比对
Fig. 5 Alignment of CRY homologies

可溶性表达。

CRY 是首先在拟南芥中发现的一种黄素蛋白，广泛存在于植物、动物等包括人在内的真核生物的

细胞内。辅因子 FAD 结合于 CRY 蛋白的 PHR 结构域的口袋中，在蛋白行使功能中发挥了重要作用。FAD 中的异咯嗪环可以感应磁场从而发生化学变



1: mutant 1 (W320); 2: mutant 2 (W374);
3: negative control; 4: mutant 3 (W397); M: Marker

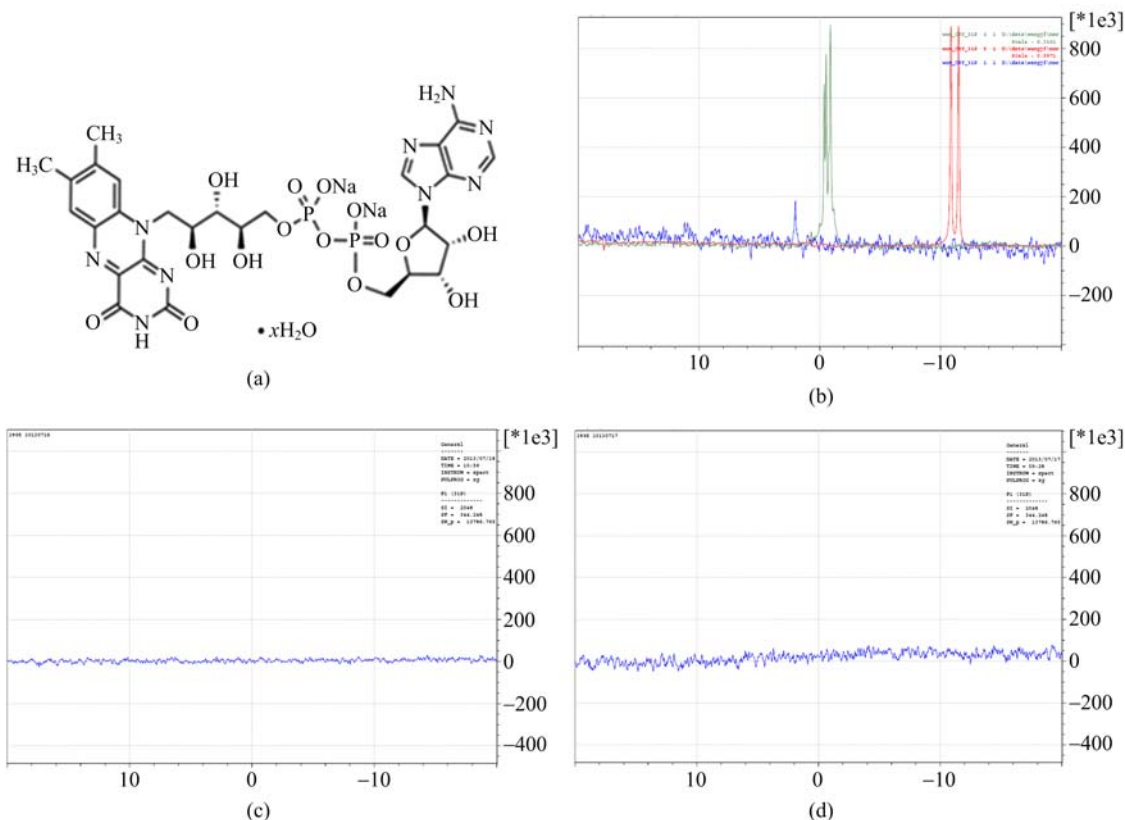
图 6 突变蛋白的 WB 检测

Fig. 6 Western Blot analysis of mutant

化. 当蓝光照射时, 会发生一系列的电子传递, 电子从蛋白表面经色氨酸三联体传递至 FAD, 形成自由基电子对 $[FAD^{\cdot-} + TrpC^{\cdot}]$, 该电子对与蛋白感应磁场及调节生物钟有关. 有实验表明, 完整的色氨酸三联体对于自由基电子对的形成不是必须的. 将帝王蝶 (*Danaus plexippus*) CRY 蛋白以及果蝇 CRY 蛋白中的色氨酸突变为苯丙氨酸对蛋白接收光信号并没有影响^[16], 瞬态 EPR 发现非洲爪蟾 (*Xenopus*) CRY-DASH 中的 FAD 可以与 $\beta 2/\alpha 2$ 上

的酪氨酸(Tyr)50 形成电子对^[17], 表明除了色氨酸以外酪氨酸也可以进行电子转移. 本实验通过³¹P 核磁共振谱表明, 突变会影响辅因子 FAD 与蛋白的结合状态, HsCRY1 突变体 1(W320F)以及突变体 2(W374F)的磷谱显示无³¹P 信号, 表明 FAD 不与这两个突变蛋白结合, 这说明这两个氨基酸对于 FAD 结合于蛋白口袋至关重要, 从而为蛋白结构的解析奠定了基础. 同时, 传递电子的色氨酸三联体的发现为探索感应磁场的自由基电子对提供了重要线索, 通过磁光检测、EPR 等实验对野生型及突变型蛋白进行自由基的测定对于更好地理解电子传递途径具有重要的意义.

目前已在拟南芥、玉米、水稻、番茄等植物和果蝇、小鼠等动物中分离到 CRY 基因, 对蛋白的基本结构、生理功能及其作用机理方面的研究已经取得了一定的进展, 但关于人类 CRY 蛋白的研究尚未见报道. 本实验通过杆状病毒-昆虫表达系统成功表达了 HsCRY1 及其 3 个突变体蛋白, 并通过磷谱检



(a) Structure of FAD; (b) ³¹P spectrum of free FAD(red), HsCRY1(green), mutant3(blue);
(c) ³¹P spectrum of mutant1; (d) ³¹P spectrum of mutant2

图 7 HsCRY1 及突变蛋白的³¹P 谱

Fig. 7 ³¹P NMR spectrum of HsCRY1 and mutants

测了其辅因子 FAD 的结合状态,结果表明突变会影响辅因子 FAD 与蛋白的结合状态,为后续研究打下了坚实的基础。

参考文献(References)

- [1] Brettel K, Byrdin M. Reaction mechanisms of DNA photolyase[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2010, 20(6): 693-701.
- [2] Müller M, Carell T. Structural biology of DNA photolyases and cryptochromes[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2009, 19(3): 277-285.
- [3] Ritz T. Cryptochrome: A photoreceptor with the properties of a magnetoreceptor[J]. *Communicative & Integrative Biology*, 2010, 3(1): 24-27.
- [4] Hitomi K. Eukaryotic class II cyclobutane pyrimidine dimer photolyase structure reveals basis for improved ultraviolet tolerance in plants[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(15): 12 060-12 069.
- [5] Fankhauser C, Ulm R. Light-regulated interactions with SPA proteins underlie cryptochrome-mediated gene expression[J]. *Genes & Development*, 2011, 25(10): 1 004-1 009.
- [6] Kiontke S. Crystal structures of an archaeal class II DNA photolyase and its complex with UV-damaged duplex DNA[J]. *The EMBO Journal*, 2011, 30(21): 4 437-4 449.
- [7] Burney S. Single amino acid substitution reveals latent photolyase activity in *Arabidopsis cry1* [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(37): 9 356-9 360.
- [8] Immeln D. Primary events in the blue light sensor plant cryptochrome: Intraprotein electron and proton transfer revealed by femtosecond spectroscopy [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(30): 12 536-12 546.
- [9] Hitomi K. Functional motifs in the (6-4) photolyase crystal structure make a comparative framework for DNA repair photolyases and clock cryptochromes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(17): 6 962-6 967.
- [10] Zoltowski B D. Structure of full-length *Drosophila* cryptochrome [J]. *Nature*, 2011, 480 (7377): 396-399.
- [11] Xing W. SCFFBXL3 ubiquitin ligase targets cryptochromes at their cofactor pocket [J]. *Nature*, 2013, 496(7443): 64-68.
- [12] Watari R. Light-dependent structural change of chicken retinal cryptochrome4[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(51): 42 634-42 641.
- [13] Smith G E, Summers M, Fraser M. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1983, 3(12): 2 156-2 165.
- [14] Imasaki T. Architecture of the Mediator head module [J]. *Nature*, 2011, 475(7355): 240-243.
- [15] Sharon M, Robinson C V. The role of mass spectrometry in structure elucidation of dynamic protein complexes[J]. *Annu Rev Biochem*, 2007, 76: 167-193.
- [16] Zhan S. The monarch butterfly genome yields insights into long-distance migration[J]. *Cell*, 2011, 147(5): 1 171-1 185.
- [17] Biskup T. Unexpected electron transfer in cryptochrome identified by time-resolved EPR spectroscopy [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(52): 12 647-12 651.