

一个新的人乙酰化酶 MAK3 的克隆、表达和纯化

汪慧强^{1,2} 李平² 翟琦巍^{1*}

(¹中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所, 上海 200031; ²四川农业大学水稻研究所, 成都 611130)

摘要 在对乙酰化酶 GNAT 家族进行研究分析的过程中, 找到一个人 GNAT 家族的新成员 MAK3。MAK3 含有一个保守的乙酰化酶结构域, 并且不同物种中的 MAK3 的蛋白质序列高度保守。通过半定量和定量 RT-PCR 检测了在不同组织中 MAK3 的 mRNA 水平。并且把 MAK3 分别克隆到了真核和原核表达质粒中, 通过免疫印迹技术证实了 MAK3 的表达。还进一步用亲和层析的方法成功纯化了细菌中表达的 MAK3, 并对纯化后的 MAK3 的酶活性进行了测定。

关键词 乙酰化酶; MAK3; 克隆; 表达; 纯化

生物分子的乙酰化修饰在生命活动过程中起着重要作用。已经发现的可以被乙酰化修饰的生物分子包括组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4; 染色质蛋白 HMG14 和 HMG17; p53、ELKF、HMGI(Y)、TCF、NF- κ B、MyoD、GATA1、E2F1、HNF4、Foxo3a 等近 40 种转录因子; PCAF、CBP、p300、MOZ 和 MORF 等乙酰化酶; flap endonuclease、thymine DNA glycosylase 等 DNA 代谢相关的酶; Smad7、 β -catenin 等重要的信号分子; 胆碱, 辅酶 A 等非蛋白质分子; 以及许多其他在生命活动过程中起着重要作用的生物分子^[1]。蛋白质的乙酰化是一种重要的翻译后修饰, 在细胞凋亡、长寿、发育、基因转录调控、细胞迁移以及在一些基本的代谢过程中起着至关重要的作用^[1-4]。同时还和肿瘤、神经退行性病变等疾病密切相关^[5,6]。

蛋白质的乙酰化修饰是通过蛋白乙酰化酶来实现的。1996 年, Brownell 等^[7]首次克隆、表达并纯化了四膜虫体内的蛋白乙酰化酶 GCN5, 同时分析鉴定了其功能和活性。目前, 从低等到高等的多种生物体中已经分离和鉴定出多种蛋白乙酰化酶。

根据蛋白乙酰化酶的结构特点, 可将其分为不同的家族, 包括 GCN5 相关乙酰化酶家族(GCN5-related acetyltransferase, GNAT), MYST 相关乙酰化酶家族, p300/CBP 乙酰化酶家族, 通用转录因子(general transcription factor)乙酰化酶家族以及核激素(nuclear hormone)相关乙酰化酶家族^[8]。GNAT 家族是蛋白乙酰化酶中极为重要的一个家族。研究表明, 该家族的乙酰化酶参与了细胞生长调控、基因转录激活和 DNA 损伤修复^[8]。GNAT 家族中的

GCN5 是第一个被分离鉴定的乙酰化酶, 它参与了有丝分裂相关基因的表达, 是酵母分裂过程中 G₂ 期过度到 M 期时的必需基因^[9,10]。GCN5L 是小鼠体内与 GCN5 同源的蛋白质, *gcn5l* 基因被剔除的小鼠会在胚胎期死亡^[11]。该家族的其他乙酰化酶如 PCAF 和 ARD1 也有十分重要的功能。PCAF 可以和 PAF400、TAF 等蛋白质相结合形成复合体, 直接乙酰化 p53 和 MyoD 等转录因子, 从而调控基因转录、细胞生长、分化和凋亡^[12]。ARD1 可以乙酰化 HIF-1 α , 使其较容易被降解, 从而抑制受 HIF-1 α 调控基因的转录^[13]。

MAK3 作为 GNAT 家族中被预测的乙酰化酶, 最早在酵母里被报道。研究提示在酵母中 MAK3 可能乙酰化 L-A 双链 RNA 病毒的主要衣壳蛋白(gag)的氨基端, 并推测这种乙酰化是病毒颗粒组装所必需的^[14]。但是 MAK3 在哺乳动物中的同源蛋白还没有报道。人的 MAK3 基因序列最早通过大规模测序获得, 但至今还没有对其克隆并进行研究的相关报道^[15]。因此对 MAK3 研究会有助于人们了解 MAK3 在哺乳动物中的生物功能。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

反转录和 PCR 试剂购自 TaKaRa 公司。细胞培养用胎牛血清及 DMEM 培养基和细胞转染试剂

收稿日期: 2005-05-11 接受日期: 2005-06-01

国家自然科学基金资助项目(No.3040083)

* 通讯作者。Tel: 021-54920903, Fax: 021-54920291; E-mail:

qwzhai@sibs.ac.cn

LipofectAMINE 2000 购自 Invitrogen 公司, 各种抗体购自 Sigma 公司。化学发光试剂 Super Signal 购自 Pierce 公司。细胞破碎仪采用 Thermo 公司的 FRENCH Press 设备。Chemi Doc 成像仪和定量 PCR 仪 iCycler 及其荧光染料均购自 Bio-Rad 公司。蛋白质纯化系统采用 Qiagen 公司的 Ni²⁺-NTA 琼脂糖产品。乙酰化酶活性测定采用 Upstate 公司的试剂盒, 用于活性测定的同位素 ³H 标记的乙酰辅酶 A 购自 Amersham 公司。同位素测定系统来自 PerkinElmer 公司。人正常组织的总 RNA 购自上海睿星基因公司。其他化学试剂购自上海生工或上海化学试剂公司。

1.2 方法

1.1.1 生物信息学 分析用“human acetyltransferase”作为关键词对 NCBI、EMBL 和 DDBJ 这 3 个数据库进行搜索, 获得了大部分的人乙酰化酶的蛋白质序列^[16-18]。然后将这些人乙酰化酶按家族进行初步分类, 并把各家族的蛋白质保守序列作为探针, 通过 PSI-BLAST 程序进行数据库搜索, 进一步获得了一些人乙酰化酶的蛋白质序列。根据所有找到的人乙酰化酶的结构特点把它们归纳整理成不同的家族。在人 GNAT 家族中找到 GenBank 登录号为 gi: 13376735 的被预测的乙酰化酶, 其基因名为 Homo sapiens Mak3 homolog, 简称 MAK3。以此基因的蛋白质序列为探针, 用 BLAST 程序进行数据库搜索, 获得该基因在同一家族和在不同物种中的同源蛋白序列。将这些序列用 Clustal W 程序进行多序列比对, 分析其序列保守性^[19]。并根据这些序列分别用 Clustal W 和 Phylo Draw 程序构建系统发生树, 分析 MAK3 在同一家族和不同物种间的进化关系^[20]。

1.1.2 MAK3 的组织分布分析 (1) 半定量 RT-PCR 检测 把人的骨骼肌、心、肝、肺、脾、胰腺、结肠和睾丸共 8 种组织的总 RNA, 反转录成 cDNA, 用于通过半定量 RT-PCR 检测 MAK3 在不同组织中的 mRNA 水平。用于 PCR 反应的引物序列为 ATGAAAGGTAGCCGGATCGAG 和 TGGCGACAAGCAAGTGCAAG。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 20 s; 56 °C 40 s; 72 °C 延伸 1 min; 26 个循环后, 72 °C 10 min。用 GAPDH 基因作为内参, 引物序列为 ATGGGGAAGGTGAAGGTC 和 GTGGTAGAAGGTC-CTCGCT。PCR 反应条件与 MAK3 相同。(2) 实时荧光定量 RT-PCR 检测 cDNA 准备及引物序列与前述方法相同。用 GAPDH 基因作为内参。按照产品说

明在反应体系中加入荧光染料 SYBR Green I 以及 Fluorescein。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 20 s; 56 °C 40 s; 72 °C 延伸 30 s; 40 个循环后, 95 °C 1 min。在 72 °C 延伸 30 s 时采集荧光。

1.1.3 MAK3 基因克隆 取新鲜培养的 HEK 293T 细胞, 用 Trizol 试剂提取总 RNA, 反转录获得 cDNA, 用于 MAK3 基因的克隆。对于 MAK3 在真核细胞表达质粒的构建, 采用本实验室构建的 pCMV-Myc-T 载体, 引物序列为 ATGAAAGGTAGCCGGATCGAG 和 TGGCGACAAGCAAGTGCAAG。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 20 s; 56 °C 40 s; 72 °C 延伸 1 min; 35 个循环后, 72 °C 10 min。将扩增出来的 PCR 片段经纯化后连接到载体中得到 MAK3 的真核表达质粒 pCMV-MAK3。对于 MAK3 在原核细菌内表达质粒的构建, 采用 Novagen 公司的 pET-30(a) 载体, 该载体含有 His 标签, 可以用于后续的表达和蛋白质纯化。引物序列为 GGAATTCATATGAAAGGTAGCCGGATCGAGCTGG 和 CCGCTCGAGGTTGTCTGTCTTTTGCACATCT。PCR 反应条件同上。将扩增出来的 PCR 片段经过适当酶切并纯化后连接到载体中得到 MAK3 的原核表达质粒 pET-30(a)-MAK3。

1.1.4 MAK3 在真核细胞中的表达和分析 HEK 293T 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。将 pCMV-MAK3 质粒用 LipofectAMINE 2000 转染细胞, 40 h 后收集细胞, 进行 Western 印迹检测。一抗为小鼠抗 Myc 和小鼠抗微管蛋白单克隆抗体, 二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠抗体。

1.1.5 MAK3 在细菌中的表达和纯化 将含有 pET-30(a)-MAK3 质粒的 BL21 大肠杆菌, 在含硫酸卡那霉素的 LB 培养基中置于摇床上 37 °C, 300 r/min 培养 12 h, 然后按 1:50 接种, 37 °C, 300 r/min 再培养 2 h。至 A₆₀₀ 值为 0.6 左右, 加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 0.1 mmol/L。在 20 °C, 300 r/min 诱导培养 16 h。在 IPTG 诱导前和诱导后分别取样, 用作 SDS-PAGE 胶电泳分析。

将收集的细菌离心, 洗涤沉淀后按每克沉淀加 5 ml 裂解液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, pH 8.0)和 1 mg 溶菌酶裂解, 在冰上放置 30 min 后用 FRENCH Press 细胞破碎仪在压强约为 2 × 10⁶ 帕斯卡破碎细胞, 破碎后高速离心, 取上清液备用。将诱导后经裂解破碎处理后的

细菌上清液和 Ni^{2+} -NTA 琼脂糖的浆液按体积比 4 : 1 混合, 4 °C 置于摇床上振摇平衡 1 h, 然后把混合物填入蛋白质纯化柱, 待液体留尽后再加入洗涤液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl , 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0)洗涤纯化柱至 A_{280} 值稳定。最后用 8 ml 洗脱液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl , 250 mmol/L 咪唑, pH 8.0)洗脱, 收集洗脱下来的液体, 用作 SDS-PAGE 胶电泳, 考马斯亮蓝染色检测。随后用 Chemi Doc 成像仪及其配套软件分析 MAK3 的蛋白质纯度。MAK3 Western 印迹检测时, 一抗为小鼠抗 His 单克隆抗体, 二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠抗体。

1.1.6 MAK3 酶活性的测定 按照乙酰化酶活性测定试剂盒的要求, 每 12.5 μl 反应体系加入 2.5 μl 反应缓冲液, 1 μl (1 μg)组蛋白, 2.5 μl 按产品要求稀释后的掺入 ^3H 标记的乙酰辅酶 A, 6.5 μl 纯化后的 MAK3。然后置于 30 °C 水浴锅中温育不同的时间。反应产物按试剂盒提供的材料和方法处理, 最后用液闪仪测定同位素放射强度。

2 结果

2.1 MAK3 的发现及其序列分析

搜索数据库并整理得到人类乙酰化酶 GNAT 家族蛋白序列, 在其中找到 MAK3 的序列(图 1a)。通过 NCBI 的保守结构域搜索工具分析 MAK3 的蛋白质序列, 发现 MAK3 含有保守的乙酰化酶结构域 Acetyltransf_1, 其起始序列为第 48 位氨基酸残基, 终止序列为第 130 位氨基酸残基(图 1b)。以该保守结构域的序列为探针, 搜索生物序列数据库, 获得人 GNAT 家族的成员, 包括 AANAT、ARD1、CSRP2BP、GCN5L2、GNPNAT1、MAK3、NAT5、NAT6、PCAF、SAT 和 SAT2。这些蛋白质序列中都含有相同的保守的乙酰化酶结构域 Acetyltransf_1。用 Clustal W 工具对这些序列进行比对分析, 获得了人 GNAT 家族的系统发生树(图 1c)。根据所构建的系统发生树, MAK3、NAT5 和 ARD1 这 3 个蛋白质的序列相似性最高, 说明它们在生物功能上可能比较相近。我们接着对 MAK3、NAT5、ARD1 和乙酰化酶保守结构域 Acetyltransf_1 的蛋白质序列进行了比对分析, 结果发现 MAK3 的蛋白质序列中存在一些高度保守的位点, 包括 Leu77、Arg84、Gly86、Leu111、Val113、Asp117、Arg120 和 Tyr124, 这些位点可能是 MAK3 乙酰化酶的活性位点(图 1d)。

为了研究 MAK3 的蛋白质序列在不同物种间的保守性, 我们搜索数据库获得了人(*H.sapiens*)、大鼠(*R.norvegicus*)、小鼠(*M.musculus*)、果蝇(*D.melanogaster*)、线虫(*C.elegans*)和酵母(*S.cerevisiae*)等 6 种生物的 MAK3 的蛋白质序列。用 Clustal W 进行序列比对分析, 结果显示 MAK3 的蛋白质序列在不同物种间具有很高的保守性(图 1e)。这一结果提示 MAK3 可能在生物体中具有非常重要的功能。

2.2 MAK3 基因的组织分布

以 GAPDH 基因为对照, GAPDH 基因电泳条带亮度一致说明使用的 RNA 量是一致的。通过 RT-PCR 半定量和定量检测出了 MAK3 基因在人 8 种正常组织里的 mRNA 丰度, 发现 MAK3 基因在八种组织中都有表达, 其中在骨骼肌、心、肝和脾中分布较多, 结肠次之, 在肺、胰腺和睾丸中较少(图 2)。骨骼肌、心和肝是体内能量代谢的重要器官, 这提示 MAK3 基因有可能在体内能量代谢调控中发挥着重要作用。

2.3 MAK3 在 HEK 293T 细胞中的表达

用 pCMV-MAK3 质粒和相应的不含 MAK3 的 pCMV 空质粒转染 HEK 293T 细胞。用于克隆 MAK3 的载体带有氨基端 Myc 标签, 克隆的 MAK3 可以和 Myc 标签在 N 端融合表达。这样可以用抗 Myc 的抗体通过 Western 印迹来检测 MAK3 融合蛋白。Western 印迹分析结果显示, 在转染了 pCMV-MAK3 质粒的细胞中观察到了大小约 21 kDa 的 MAK3 融合蛋白的表达, 在转染了空质粒的对照细胞中没有看到 MAK3 融合蛋白的表达(图 3a)。而微管蛋白抗体检测结果显示蛋白质上样量是一致的。以上结果说明我们成功地构建了 MAK3 真核细胞表达质粒, 并且观测了 MAK3 融合蛋白在真核细胞中的表达。这一结果为进一步在真核细胞内通过过量表达 MAK3 研究其蛋白质功能打下了基础。

2.4 MAK3 在大肠杆菌中的表达及纯化

pET-30(a)载体中羧基端带有 His 标签, 用该载体表达的融合蛋白可用 Ni^{2+} -NTA 琼脂糖通过亲和层析进行纯化, 并可用抗 His 抗体进行 Western 印迹检测。将诱导表达不同阶段收集的样品以及纯化后的蛋白质样品进行 SDS-PAGE 胶电泳, 考马斯亮蓝染色。IPTG 诱导前后相比, 诱导后的蛋白质样品在约 21 kDa 附近出现了一条预期的 MAK3 融合蛋白条带; 诱导后的蛋白质样品经 Ni^{2+} -NTA 琼脂糖纯化后, 电泳分析得到比较单一的目的蛋白条带(图

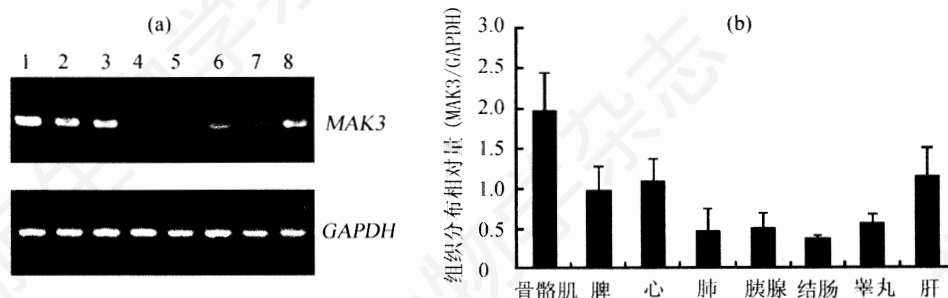


图2 MAK3 基因在人不同组织中的 mRNA 水平

(a)半定量 RT-PCR 检测。1: 骨骼肌; 2: 脾; 3: 心; 4: 肺; 5: 胰腺; 6: 结肠; 7: 睾丸; 8: 肝。 (b)实时荧光定量 RT-PCR 检测。

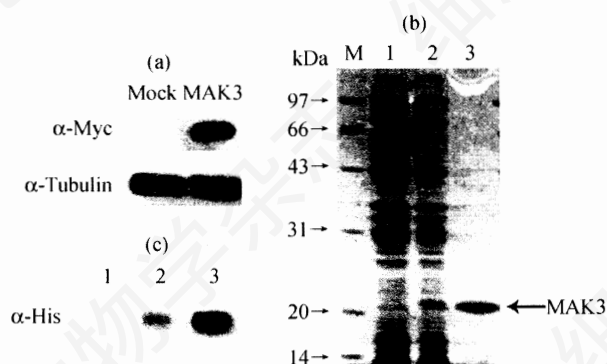


图3 MAK3 的表达和纯化

(a)MAK3 在 HEK 293T 细胞中的表达。 (b)考马斯亮蓝染色检测 MAK3 融合蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化。M: marker; 1: 诱导前; 2: 诱导后; 3: 纯化后。 (c)Western 印迹检测 MAK3 融合蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化。1: 诱导前; 2: 诱导后; 3: 纯化后。

3b)。经 Chemi Doc 成像仪分析, 纯化后的 MAK3 融合蛋白, 蛋白质纯度约为 95%。用小鼠抗 His 的抗体做 Western 印迹, 检测到了蛋白质的表达, 且大小与预期的完全一致(图 3c)。这说明我们成功地构建了 MAK3 原核表达质粒, 并且纯化得到了高纯度的 MAK3 融合蛋白, 为后续制备 MAK3 抗体, 分析酶活性创造了条件。

2.5 MAK3 乙酰化酶活性的测定

从蛋白质序列结构上分析 MAK3 是一个新的乙酰化酶, 为了证明其酶活性, 我们用乙酰化酶活性测定的试剂盒对纯化后的 MAK3 进行了活性测定。结果显示, 随着反应时间的延长, 加入 MAK3 实验组的 CPM 读数升高, 说明被同位素标记的乙酰基越来越多地被转移到反应产物上, 乙酰辅酶 A 被消耗的量不断增加; 而加入 BSA 对照组的 CPM 值没有明显变化(图 4)。该结果表明, 与非乙酰化酶的 BSA 相比, MAK3 具有乙酰化酶活性, 能催化乙酰基转移的反应。

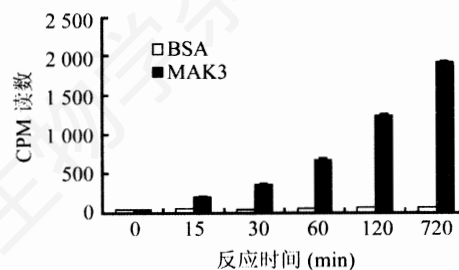


图4 ^3H 同位素标记乙酰辅酶 A 测定 MAK3 乙酰化酶活性

3 讨论

包括人类基因组在内的近 100 个物种的基因组测序已经基本完成^[21]。如何利用这些基因组的数据对未知蛋白质进行研究, 已经成为现代生物学所面临的一个巨大挑战。本研究立足于人类基因组, 系统化地归纳和整理了乙酰化酶 GNAT 家族, 从中发现了人乙酰化酶 MAK3, 对其进行了序列分析。我们检测了 MAK3 基因的组织分布, 并进一步完成了对 MAK3 的克隆、表达和纯化, 然后对纯化后的 MAK3 的乙酰化酶活性进行了测定。

MAK3 的蛋白质序列比对分析显示, 在几种常见模式生物中有很高的保守性, 这提示该蛋白质无论在低等生物还是在高等生物中都有很重要的功能。MAK3 作为 GNAT 家族成员与该家族其他成员相比, 在蛋白质序列结构上具有相似性, 都含有保守的乙酰化酶结构域 Acetyltransf_1。含有此结构域的其他蛋白质已被实验证实有乙酰化酶活性, 因此可以推测 MAK3 也具有乙酰化酶的活性。GNAT 家族中 MAK3 与 NAT5 和 ARD1 这两个蛋白质序列相似性最高, 并且都拥有一些极为保守的位点。这提示 MAK3 的功能与这两个蛋白质可能比较相似。

通过半定量和定量检测 MAK3 在体内的组织分布, 我们可以看出 MAK3 与体内的能量代谢有一定

的关系, 因此研究 MAK3 对研究代谢将有十分重要的意义。

在成功地构建了 MAK3 真核细胞表达的质粒后, 可以通过其在细胞内过量表达来研究 MAK3 的生物功能。例如用 MAK3 和一些转录因子的报告基因质粒共转染细胞, 然后检测 MAK3 是否对该转录因子有激活作用。由于已知有很多转录因子可以被乙酰化修饰, 如果检测出来有激活作用, 可以尝试分析 MAK3 是否对该转录因子直接通过乙酰化修饰而发挥作用, 还是通过其他间接的途径起作用。

在细菌内表达并得到纯化的 MAK3, 一方面可以用来注射家兔, 从而制备多克隆抗体, 用于 MAK3 的研究; 另一方面如果能找到可能的乙酰化酶底物, 就可以在体外用纯化的 MAK3 来检测其乙酰化酶活性。

本研究在得到纯化后的 MAK3 融合蛋白后, 设计了测定其乙酰化酶活性的实验, 实验结果表明纯化得到的蛋白质具有一定的酶活性, 但不是很高。这说明蛋白质纯度比较低, 可能与表达和纯化工艺有关。为了得到纯度更高的蛋白质, 可以适当调整

蛋白表达的条件, 换用更加精密的设备如 HPLC 或 FPLC 来进行纯化, 从而得到高纯度的蛋白质。

参考文献 (References)

- [1] Yang XJ. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**: 959
- [2] Luo J *et al. Cell*, 2001, **107**: 137
- [3] Lin SJ *et al. Science*, 2000, **289**: 2126
- [4] Cheng HL *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 10794
- [5] Marks P *et al. Nat Rev Cancer*, 2001, **1**: 194
- [6] Mattson MP. *Ageing Res Rev*, 2003, **2**: 329
- [7] Brownell JE *et al. Cell*, 1996, **84**: 843
- [8] Carrozza MJ *et al. Trends Genet*, 2003, **19**: 321
- [9] Zhang W *et al. EMBO J*, 1998, **17**: 3155
- [10] Krebs JE *et al. Cell*, 2000, **102**: 587
- [11] Xu W *et al. Nat Gene*, 2000, **26**: 229
- [12] Schiltz RL *et al. Biochim Biophys Acta*, 2000, **1470**: M37
- [13] Jeong JW *et al. Cell*, 2002, **111**: 709
- [14] Tercero JC *et al. J Biol Chem*, 1992, **267**: 20277
- [15] Ota T *et al. Nat Genet*, 2004, **36**: 40
- [16] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- [17] <http://www.embl.org>
- [18] <http://www.ddbj.nig.ac.jp>
- [19] <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>
- [20] Choi JH *et al. Bioinformatics*, 2000, **16**: 1056
- [21] Zhu H *et al. Annu Rev Biochem*, 2003, **72**: 783

Cloning, Expression and Purification of a Novel Human GCN5-related Acetyltransferase, MAK3

Hui-Qiang Wang^{1,2}, Ping Li², Qi-Wei Zhai^{1*}

¹Institute for Nutritional Science, Shanghai Institutes for Biological Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

²Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract A novel human GCN5-related acetyltransferase, MAK3 was found by bioinformatical analysis of the GNAT family. Human MAK3 contains a conserved acetyltransferase domain and the protein sequence of MAK3 is highly conserved in different species. We detected mRNA level of MAK3 in different tissues by semi-quantity and full quantity RT-PCR and cloned MAK3 into both mammalian and bacterial expression vectors, and the expression of MAK3 was confirmed by Western blot. MAK3 expressed in bacteria was further purified with affinity chromatography. Moreover, the enzyme activity of purified MAK3 protein was also detected.

Key words acetyltransferase; MAK3; cloning; expression; purification

Received: May 11, 2005 Accepted: June 1, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.3040083)

*Corresponding author. Tel: 86-21-54920903, Fax: 86-21-54920291, E-mail: qwzhai@sibs.ac.cn