

大肠杆菌冷休克蛋白 CspC 的分离纯化 及部分性质测定*

刘 威 李 瑶¹⁾ 向 烨 王大成^{**}

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 经 Sepharose Q Fast Flow 阴离子交换层析和 Superdex 30 凝胶过滤层析, 从大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 细胞内分离纯化了一种小分子蛋白质, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 纯度鉴定为单一条带, 经质谱分析、N 端测序、同源序列比较, 确定该蛋白质为大肠杆菌冷休克蛋白 CspC. 在此基础上, 用圆二色光谱测定了其二级结构含量, 初步探索了其热稳定性及与单链 DNA 结合后的构象变化.

关键词 冷休克蛋白, CspC, 大肠杆菌, 纯化

学科分类号 Q512.2

几乎所有单细胞生物在环境温度急剧下降时都会产生应激反应, 在此过程中大部分蛋白质的合成被终止, 但有一类蛋白质的表达却急剧增加, 这类蛋白质被称为冷休克蛋白 (cold shock protein, CSP)^[1~5]. 到目前为止, 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中共发现了该家族的 9 种蛋白质, 这些成员都是由 68 到 74 个氨基酸构成的小分子蛋白质, 而且它们之间具有较高的同源性 (44% ~ 80%), 其中包括一个高度保守的 RNA 结合区域^[6]. 目前普遍认为 CSP 的功能是作为 RNA 分子伴侣 (RNA chaperone) 与细胞中的 mRNA 结合, 稳定 mRNA, 促进翻译^[1~3]. 在大肠杆菌的 CSP 家族中, CspA 是主要成员, 也是被最先发现而又研究得最为充分的. 由 CspA 的三维结构可以看出, CSP 包含 5 条 β 折叠链, 围成一个希腊钥匙型的 β 桶 (Greek-key β -barrel), 这种结构又称为冷休克结构域 (cold-shock domain, CSD)^[2,6]. 除原核生物外, 目前已在许多真核生物中发现了若干与 CSP 同源的蛋白质家族, 如 Y-box, Lin28, UNR 等^[7], 它们的一级序列中均包含一个或多个冷休克结构域, 因此有人把这些蛋白质家族与 CSP 一起合称为 CSD 超家族^[2,7]. 然而, 除 CspA 外, 大肠杆菌 CSP 家族中的其他成员则研究得较少, 可能的原因是相对 CspA 而言, 其他成员在细胞内相对含量较低. CspC 作为其中之一, 相关报道也很少. 与 CspA 不同的是, CspC 不是在低温下诱导产生的, 在常温下即存在于细胞内^[1,3,4], 其功能可能与细胞分裂有关. 为了深入研究 CSP 家族中主要成员的结

构-功能关系, 获得高度纯化的样品是一个基本条件. 本文报道了一种分离纯化 *E. coli* 冷休克蛋白 CspC 的快速有效的方法, 产率为 5 mg/L 菌液. 在此基础上进一步研究了其圆二色光谱性质, 初步探索了热稳定性及其与单链 DNA 结合后的构象变化, 为以后更深入地研究 CspC 提供了条件.

1 材料与方法

1.1 菌株、培养基及主要化学试剂

大肠杆菌菌株 BL21 由本实验室保存, 培养基购自德国 Merck 公司, 各种层析介质均为瑞典 Pharmacia 公司产品, 其他试剂均为国产分析纯试剂.

1.2 菌体培养

选取 BL21 单菌落, 接种到 5 ml LB 培养基中, 37 °C 培养过夜. 按 1:50 将过夜菌液稀释到新鲜 LB 培养基中. 37 °C 培养到 A_{600} 约为 0.7 左右, 降低温度到 25 °C, 继续培养 6 h.

1.3 分离和纯化

1 L 菌液在 4 °C 下 4 000 r/min 离心 20 min, 弃去上清. 沉淀重悬于 80 ml 30 mmol/L 甘氨酸-NaOH, pH 9.0 的缓冲液中. 立即加入溶菌酶至终浓度为 10 mg/L, 30 °C 水浴 30 min, 超声波裂解细胞, 超声波功率为 180 W, 时间 2.5 min. 裂解液在 4 °C 下, 14 000 r/min 离心 30 min, 保留上清,

* 国家自然科学基金资助项目 (39970158).

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888547, E-mail: dewang@sun5.ibp.ac.cn

¹⁾ 中国科学技术大学 1996 级本科生.

收稿日期: 2001-04-19, 接受日期: 2001-06-11

体积约 80 ml. 分两次将上清液上样于预先用同样缓冲液平衡 5 个柱体积的 Sepharose Q Fast Flow (1.6 cm × 30 cm) 柱上, 同样条件洗脱两个柱体积, 以除去未挂柱的杂蛋白, 随后用含 0.175 mol/L NaCl 的上述缓冲液洗脱 4 个柱体积, 收集此过程中的洗脱液. 将此洗脱液对 0.05 mol/L NH_4HCO_3 透析过夜. 透析液冻干后用 3 ml 0.05 mol/L NH_4HCO_3 重新溶解, 以每次 1 ml 的上样体积上样于 Superdex 30 (1.6 cm × 60 cm) 柱. 用同样缓冲液作平衡液和洗脱液, 收集洗脱体积为 52 ml 的洗脱峰, 冻干成蛋白干粉, 4 °C 保存备用.

1.4 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 按 Schagger 的方法^[8]进行三层不连续电泳, 浓缩胶、间隔胶、分离胶的浓度分别为 4%、10% 及 16.5%, 缓冲体系为 Tris-Tricine 体系, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 用 Pharmacia 公司的多肽蛋白标准作对照.

1.5 蛋白质浓度测定

按 Bradford 方法^[9]进行, 以人胰岛素为标准蛋白质.

1.6 蛋白质分子质量测定

蛋白质亚基的分子质量由 SDS-PAGE 测得, 是否形成多聚体在凝胶过滤柱 Superdex 30 (1.6 cm × 60 cm) 上测定, 精确的蛋白质分子质量由基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 测定.

1.7 蛋白质 N 端序列分析

N 端前 10 位氨基酸残基的序列在 Applied Biosystems 公司的 PROCISE 蛋白质自动测序仪上测定.

1.8 蛋白质同源性比较

采用 NCBI 服务器提供的 ungapped blastp 程序进行蛋白质同源序列搜索.

1.9 圆二色性光谱测量

将纯化后的 CspC 溶解于 20 mmol pH 7.5 的磷酸缓冲液中, 蛋白质浓度为 2.5 g/L, 于 0.1 mm 光径的 CD 杯中进行远紫外 CD 谱扫描, 扫描范围 190~260 nm, 4 次扫描得到最终的色谱图. 圆二色谱仪为日本产 JASCO-720.

1.10 CspC 热稳定性研究

蛋白质样品分别在室温、70 °C 和 84 °C 水浴中保温 15 min 后, 进行 CD 谱测量.

1.11 CspC 与单链 DNA 结合后的构象变化

将 CspC 与一段随机合成的单链 DNA 按摩尔比 1:1 混匀后, 分别在 0 °C 和 30 °C 水浴中共同保温 70 min, 进行 CD 谱测量, 并用同样浓度的 DNA 做对照. 最终的 CD 谱由蛋白质与 DNA 混合样品的 CD 谱与 DNA 单独样品的对照 CD 谱相减而得到.

2 结果与讨论

2.1 菌体培养

虽然属于冷休克蛋白家族, 但 CspC 却并非是在低温下诱导产生的. 然而, 由于冷休克蛋白家族的成员通常在 37 °C 时很不稳定, 极易被菌体内的蛋白酶降解^[10], 所以我们选择了大肠杆菌 B 系菌株 BL21 进行培养. BL21 是一种蛋白酶缺陷型菌株, 缺乏两种主要的蛋白酶: lon 和 ompT, 因此 BL21 常被选作外源蛋白表达的宿主菌, 同样道理我们也选择了这种菌株. 另外, 为了获得更高产率的 CspC, 当细菌生长进入对数期以后, 我们又将温度降到 25 °C, 以进一步稳定 CspC. 同时, 考虑到 CspA 等会在低于 15 °C 时被大量诱导表达, 而 CspA 与 CspC 的同源性较高 (69%), 理化性质相似, 如果将培养温度降得过低, 则可能给分离纯化 CspC 带来困难.

2.2 离子交换层析

为了避免 CspC 的降解, 我们选用 Sepharose Q Fast Flow 作为第一步层析的介质, 以便快速分离纯化 CspC, 这种填料的特点就是流速快, 通常可达 3 ml/min. 由图 1 可见, 分级洗脱时当 NaCl 浓度分别为 0, 0.175 和 0.5 mol/L, 共有三组峰被分级洗脱. 经 SDS-PAGE 电泳检测, CspC 出现在第二组峰中, 而大部分杂蛋白却主要出现在第一和第三组峰中.

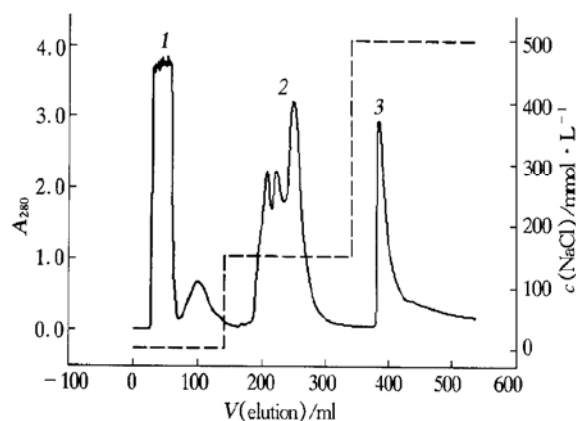


Fig. 1 Chromatography of CspC purified with Sepharose Q Fast Flow XR 16/30

—: A_{280} ; - - - : $c(\text{NaCl})$.

三组峰中。

2.3 凝胶过滤层析

由于 CspC 属于分子质量较小的蛋白质 (7.2 ku), 所以将上述第二组峰合并收集, 透析除盐后过 Superdex 30 柱。Superdex 30 的排阻极限为 10 ku, 而大部分剩余杂蛋白的分子质量都大于 10 ku, 因此这一步层析可以取得非常好的纯化结果 (图 2)。根据 CspC 的分子质量大小, 可以预计其洗脱体积为 52~54 ml, 实验结果也确实在该位置出现了一个小峰。将该峰收集冻干后称重, 每升菌液中可得 5 mg 纯蛋白质。

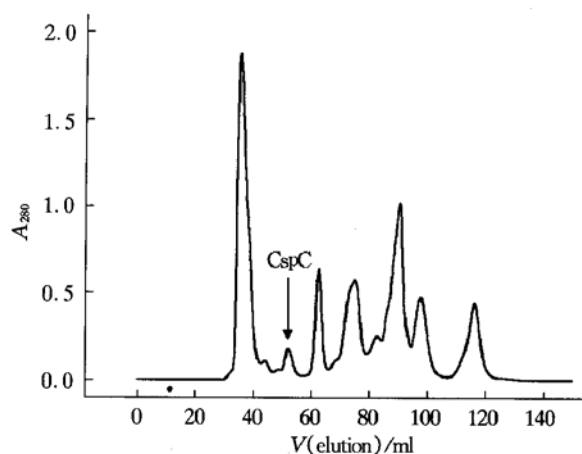


Fig. 2 Chromatography of CspC purified with Superdex 30 XR 16/60

2.4 纯度及分子质量

用 SDS-PAGE 检测 CspC 的纯度, 结果见图 3,

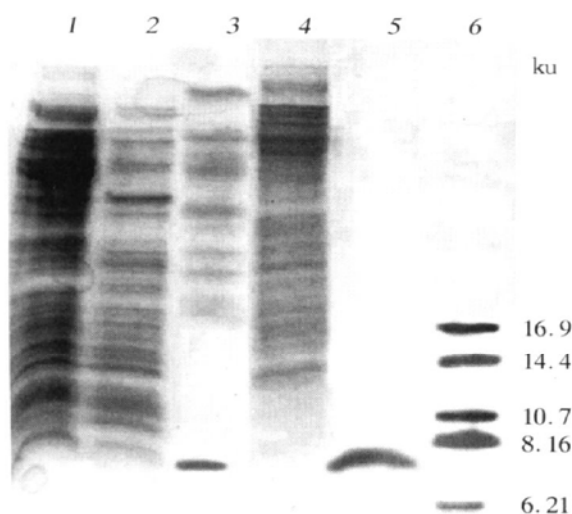


Fig. 3 SDS PAGE analysis of CspC

1: lysate of BL21; 2: peak 1 of Sepharose Q Fast Flow chromatography; 3: peak 2 of Sepharose Q Fast Flow chromatography; 4: peak 3 of Sepharose Q Fast Flow chromatography; 5: purified CspC from superdex 30 chromatography; 6: standard peptide marker.

由图 3 可见在 7.2 ku 处出现单一条带, 电泳扫描后计算, 纯度可达 95% 以上。同时, 结合凝胶过滤层析的结果, 可以看出 CspC 为单亚基蛋白质, 这与冷休克蛋白家族的其他成员是一样的^[11]。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法测定 CspC 的精确分子质量为 7252.7 u (图 4)。

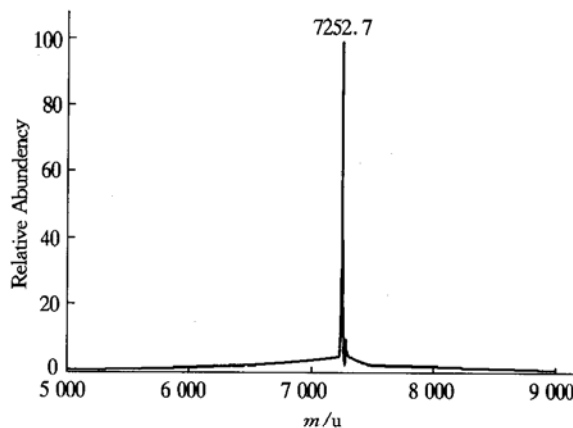


Fig. 4 MALSI-TOF mass spectrum of CspC

2.5 N 端测序

N 端分析表明纯化样品为单链分子, 其前 10 位氨基酸残基的测序结果是 Ala-Lys-Ile-Lys-Gly-Gln-Val-Lys-Trp-Phe。

2.6 同源序列查找

将测序结果输入到 NCBI 服务器上, 共搜索到两条同源序列, 一条为 *Escherichia coli* 的 CspC; 另一条为 *Buchnera* sp. APS. 的 CspC。而且, 输入的序列均对应于这两条同源序列的 2~11 位 (第一位为甲酰甲硫氨酸)。虽然有些大肠杆菌蛋白在翻译、折叠成为成熟蛋白质之后 N 端仍保留了甲酰甲硫氨酸 (fMet), 但 CspC 却在翻译后加工过程中切除了起始的 fMet^[12], 从而产生长度为 68 个残基的成熟肽。因此, 可以认为在本实验中纯化的蛋白质就是大肠杆菌的冷休克蛋白 C。

2.7 CspC 的圆二色光谱测量

对纯化后的 CspC 进行圆二色光谱测量, 并利用 Secondary Structure Estimation 软件包对其 CD 谱进行拟合计算, 得到 CspC 二级结构的初步信息 (表 1)。由此 CD 谱 (图 5) 及其计算结果可见, CspC 的二级结构确实以 β 折叠为主 (40.5%), 如果加上 β -turn, 其 β 的总量达到 65.8%。

Table 1 Secondary structure of CspC at room temperature, 70 °C and 84 °C respectively

Temperature	α helix/ %	β -sheet/ %	β -turn/ %	Random/ %	RMSD/ %
25 °C	28.6	40.5	25.3	5.6	16.05
70 °C	23.1	38.7	19.6	18.6	19.52
84 °C	29.4	37.5	18.7	14.4	17.54

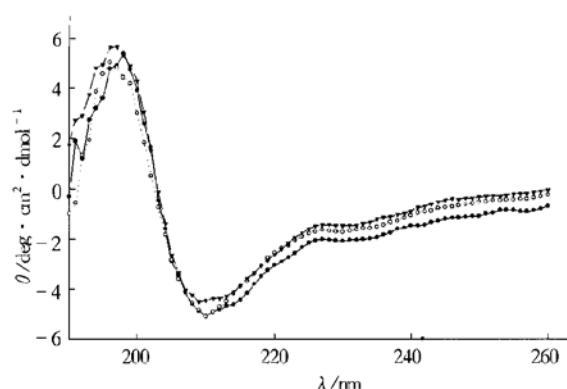


Fig. 5 CD spectra of CspC

●—●: CD spectrum recorded at room temperature; ○—○: CD spectrum recorded after incubation at 70 °C for 15 min; ▲—▲: CD spectrum recorded after incubation at 84 °C for 15 min.

在冷休克蛋白家族中, 大肠杆菌 CspA 和芽孢杆菌 CspB 的晶体结构已被解析^[6, 11, 13, 14]. 从这两个结构来看, 冷休克蛋白属于典型的 β 蛋白, 由 5 条 β -strand 围成一个 β 桶, 从而形成一个独特的冷休克结构域 (cold-shock domain, CSD), 此结构域中又包含了一个与 RNA 或单链 DNA 结合的区域. 以上结果表明, CspC 的二级结构与 CspA 和 CspB 是相似的; 再考虑到 CspC 与 CspA 的高度同源性 (69%), 所以估计 CspC 的三维结构 (特别是其 CSD 结构域) 与 CspA 应是相似的.

2.8 CspC 热稳定性研究

由图 5 与表 1 可见, CspC 分别在室温, 70 °C 和 84 °C 水浴中保温 15 min 后, 所测量的 CD 谱没有明显变化, 在考虑到定量误差的情况下, 拟和计算结果基本相同, 说明 CspC 是一种热稳定性很好的蛋白质, 在高温下构象变化不大. 形成 β 桶结构的蛋白质通常都有较高的热稳定性, 如 Cu, Zn 超氧化物歧化酶^[15], CspC 的热稳定性很可能也源于这种结构.

2.9 CspC 与单链 DNA 结合后的构象变化

目前普遍认为冷休克蛋白的主要功能是作为 RNA 伴侣 (RNA-chaperone) 与 mRNA 结合, 从而起到稳定 mRNA, 防止其降解, 促进翻译的作用. 通常情况下, 冷休克蛋白在细胞内不稳定, 很

容易受到蛋白酶的 attack 而降解, 但有学者报道芽孢杆菌中的 3 种冷休克蛋白在体外与 RNA 或单链 DNA 结合后, 蛋白质就会变得很稳定, 不再被蛋白酶降解^[10]. 冷休克蛋白与 RNA 或单链 DNA 的结合是非特异性的, 虽然不同的 CSP 之间存在不同程度上的偏好^[1, 2, 7]. 为了验证 CspC 与 RNA 或单链 DNA 结合后构象是否发生变化, 我们随机合成了一段 35 bp 长的单链 DNA, 并与 CspC 混和, 分别在 0 °C 和 30 °C 保温 70 min 后测 CD 谱, 所得结果 (图 6) 显示 CspC 与单链 DNA 在 30 °C 保温后构象显著变化, 而在 0 °C 时构象变化不大. 这很可能说明, CspC 在常温下比在低温下更易与 mRNA 或单链 DNA 结合, 从而保持其基本结构的稳定性.

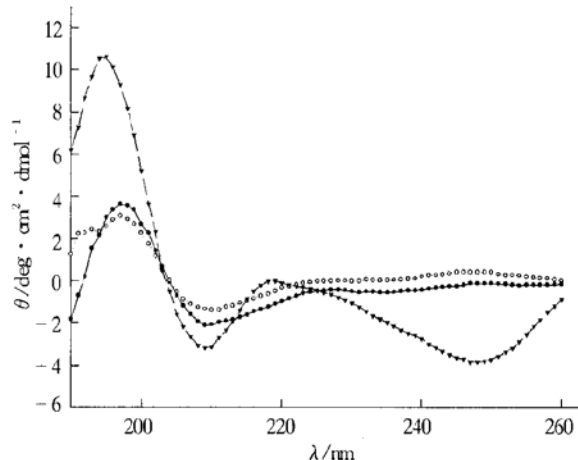


Fig. 6 CD spectra of CspC binding single strand DNA

●—●: CD spectrum of CspC; ○—○: CD spectrum of CspC binding single strand DNA at 0 °C; ▲—▲: CD spectrum of CspC binding single strand DNA at 30 °C.

近十几年来, 作为蛋白质分子伴侣的热休克蛋白一直是研究热点, 而冷休克蛋白的研究虽然起步较晚, 但作为另一类分子伴侣——RNA-chaperone, 其研究热潮近几年来正在悄然上升. 关于 CSD 的许多细节现在还不很清楚, CSD 超家族中很多成员的具体功能也无从知晓, 这些都有待人们去进一步探索. 本文不仅提供了一种分离纯化大肠杆菌 CspC 的快速而又行之有效的方法, 而且利用圆二

色光谱对其结构与功能关系进行了初步探索, 为进一步深入研究建立了基础, 提供了条件.

参 考 文 献

- 1 王振雄, 周培瑾. 冷激蛋白 CspA 家族. 生物工程学报, 1999, **15** (2): 131~ 134
Wang Z X, Zhou P J. Chin J Biotech, 1999, **15** (2): 131~ 134
- 2 Jiang W, Hou Y, Inouye M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. J Biol Chem, 1997, **272** (1): 196~ 202
- 3 Bae W, Jones P G, Inouye M. CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*, negative regulates its own gene expression. J Bacteriol, 1997, **179** (22): 7081~ 7088
- 4 Derzelle S, Hallet B, Francis K P, *et al.* Changes in *cspL*, *cspP*, and *cspC* mRNA abundance as a function of cold shock and growth phase in *Lactobacillus plantarum*. J Bacteriol, 2000, **182** (18): 5105~ 5113
- 5 Mujacic M, Cooper K W, Baneyx F. Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in *Escherichia coli*: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein. Gene, 1999, **238** (2): 325~ 332
- 6 Feng W, Tejero R, Zimmerman D E, *et al.* Solution NMR structure and backbone dynamics of the major cold-shock protein (CspA) from *Escherichia coli*: Evidence for conformational dynamics in the single-stranded RNA-binding site. Biochemistry, 1998, **37** (31): 10881~ 10896
- 7 Graumann P L, Marahiel M A. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. Trends Biochem Sci, 1998, **23** (8): 286~ 290
- 8 Schagger H, Jagow G V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem, 1987, **166** (2): 368~ 379
- 9 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, **72**: 248~ 254
- 10 Schindler T, Graumann P L, Perl D, *et al.* The family of cold shock proteins of *Bacillus subtilis*. J Biol Chem, 1999, **274** (6): 3407~ 3413
- 11 Reid K L, Rodriguez H M, Hillier B J, *et al.* Stability and folding properties of a model β -sheet protein, *Escherichia coli* CspA. Protein Sci, 1998, **7** (2): 470~ 479
- 12 Wasinger V C, Humphrey-Smith I. Small genes/gene-products in *Escherichia coli* K-12. FEMS Microbiol Lett, 1998, **169** (2): 375~ 382
- 13 Lopez M M, Makhataдзе G I. Major cold shock proteins, CspA from *Escherichia coli* and CspB from *Bacillus subtilis*, interact differently with single-stranded DNA templates. Biochim Biophys Acta, 2000, **1479** (1~ 2): 196~ 202
- 14 Tainer J A, Getzoff E D, Richardson J S, *et al.* Determination and analysis of the 2 Å structure of copper, zinc superoxide dismutase. J Mol Biol, 1982, **160** (2): 181~ 217
- 15 Schindelin H, Jiang W, Inouye M, *et al.* Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, **91** (11): 5119~ 5123

Purification and Partial Characterization of The Cold Shock Protein CspC from *Escherichia coli**

LIU Wei, LI Yiao¹⁾, XIANG Ye, WANG Da-Cheng**

(Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract After two-step chromatography of Sepharose Q Fast Flow and Superdex 30, a small protein with molecular size of 7.2 ku was purified from *Escherichia coli*. The purity examined by SDS-PAGE showed as a single band. Its molecular mass measured by mass spectrum and the amino acid sequence of N terminal were in consistence with CspC, one of the cold shock proteins, in *E. coli*. Subsequently, the content of its secondary structure was estimated from the circular dichroism spectra, and moreover, its stability in high temperature and the conformational change after binding with single strand DNA were monitored with a CD spectrophotometer.

Key words *Escherichia coli*, cold shock protein, CspC, purification

* This work was supported by a grant from the National Natural Foundation of China (39970158).

** Corresponding author. Tel: 86-10-64888547, E-mail: dcwang@sun5.ibp.ac.cn

¹⁾ University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China.

Received: April 19, 2001 Accepted: June 11, 2001