荧光检测 RecA Intein 的体外剪接活性及抑制

（GFP 体系）

撰写：潘妍，刘嬿，2012-01-04

补充:

实验准备:

- 菌株:　BL21;
- 质粒 DNA:　pHGmU，氨苄抗性;
- 其它：准备 LB 培养液；250 mM EDTA　pH=7.0 ；
- 钴柱或镍柱:（同样的上样量，通过柱上复性，Ni 柱得到的蛋白量比 Co 柱多,但 Co 柱纯化得到蛋白剪接产物的荧光吸收峰更窄）
- 预配制 20 mM磷酸缓冲液 (pH 7.0)：取 11.54 mL 0.5M Na_2HPO_4，8.46 mL 0.5 M NaH_2PO_4，定容到 500 mL (参考分子克隆书配制pH 7.0 的磷酸buffer)；将上述溶液调节为以下三种缓冲液:

  1. Buffer A：20 mM 磷酸 Buffer pH=7.5，0.5 M NaCl
  2. Buffer B：Buffer A + 8 M 尿素 pH = 7.0 ~ 7.5
  3. Buffer C：Buffer A + 0.5 M 精氨酸+200 mM 咪唑， pH=7.0

  【注意】: 配制 Buffer B 和 Buffer C 时，因加入尿素和精氨酸，pH 会有所变化，特别是 0.5 M 的精氨酸和 200 mM 咪唑对 pH 的改变非常大，故还需用 HCl 调整。（如果缓冲溶液的 pH 不准确，蛋白无法复性，后面的抑制实验无法进行）

- 实验中涉及到的 Buffer 的配制，所有上柱的 Buffer 配制好后都要过半径 0.22 μm 的滤膜。

实验操作:

步骤一：制备感受态细胞以及甘油菌的冻存

1. 感受态细胞用的是 BL21,制备方法参照分子克隆手册第？页。
2. 质粒为 pHGmU，　氨苄抗性。
3. 将质粒转化到感受态细胞中（参照分子克隆手册第？页），制成甘油菌冻存在-80℃冰箱中。

步骤二：GFP-intein 蛋白的表达、纯化和复性

准备工作

1. 在 10 ml 试管中加入 4 ml LB 培养液，灭菌后加入 4 μL 1M Amp。在 1L 的锥形瓶中加入 500 mL 的 LB，灭菌后加入 500 μL 1M 的 Amp;
2. Co 柱的准备(来自于前次 Arg 处理后的树脂)：取 5-6 ml Co 螯合树脂，加入大约一两个柱体积的 250mM EDTA，将 Co 柱上的 Co 络合掉;用二级水冲洗几遍以除去多余的 EDTA;加入约 4 个柱体积的 Co 溶液使柱子再生(在摇床上结合 12 h 或过夜)，随后用约十几个柱体积的二级水冲洗去掉多余的 Co；最后用约 4 个柱体积 Buffer B 平衡 Co 柱(将 Co 柱置于旋转摇床上 20 ~ 30min);

【说明】钴柱与镍柱的差异

蛋白表达、纯化与复性

3. 挑菌：从-80°C 冰箱中取出冻存的甘油菌，不能等到其融化，立即从冻存管中挑取一小块甘油菌到装有 4mL LB 的小管;
4. 在 37°C摇菌大约 5 h后，待小管内的液体浑浊(OD_{600}≈0.8)
5. 扩大: 将每 4ml 菌液转移到装有 500 mL LB 的锥形瓶中，在 37°C 下摇菌扩大；(依据表达量，可能需要多个小管培养液;

   【注】: 建议将 4 ml 菌液转入 30-50 ml LB 中过夜培养，然后转入 500-1000 ml 培养液中，使起始 OD 约为 0.05，有利于细菌快速生长。)
6. 待菌液的OD_{600}约为 0.6 时，向每个 500 ml培养液的锥形瓶中加入 200 μL 1M的IPTG（终浓度为 0.4 mM）诱导，37°C诱导 5~6 小时后收菌（经过实验优化，诱导 5~6 个小时得到目标蛋白的量最大）
7. 离心收菌，4°C、 4000 rpm，20 分钟。
8. 将 1 L 菌液中得到的菌块用 30 ml Buffer A 重悬，超声破碎（6 号变幅杆，1L 菌液大约超声 5-8 min，设置为 2's 超声+2'暂停），
9. 离心(4℃，16000 rpm，30 分钟)，弃上清；(上清留样跑电泳)。

10. 洗杂蛋白：用含 30 ml 2 M 尿素的 Buffer A 重悬，去除杂蛋白，（电泳已证明 2 M 尿素不会将目标蛋白从包涵体中溶解），离心 30 分钟（4℃，16000 rpm，），弃上清；（上清留样跑电泳）。

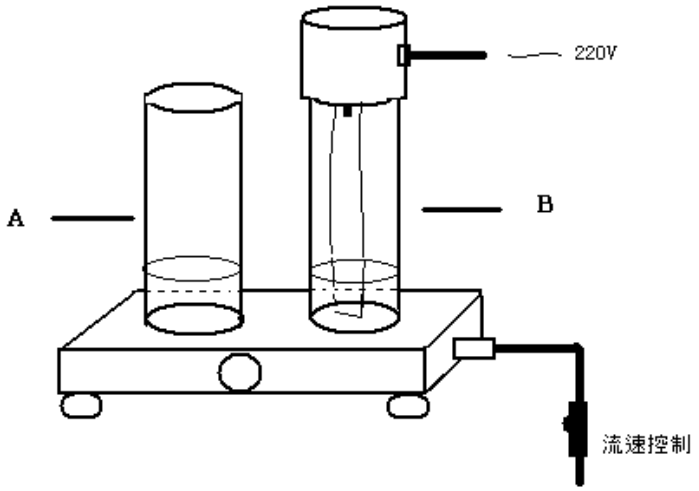
11. 用含 8M 尿素的 Buffer A 重悬（溶解包涵体中的目标蛋白），离心（16000rpm，4°C，30 分钟），留上清（上清中溶解的包含目的蛋白）。

12. 过滤膜除去杂质，否则使树脂变黑，缩短柱子使用寿命。可以先过半径 0.8 μm 的滤膜，再过 0.45 μm 的滤膜，最后过 0.22 μm 的滤膜，（这步必不可少）

13. 将溶于 8M 尿素的蛋白溶液注入 Co 柱（经 buffer B 平衡），在 4℃冰箱中的旋转摇床上结合 30min;

14. 梯度洗脱复性：用不含尿素的 Buffer A 梯度稀释含有 8 M 尿素的 Buffer B，在柱子上进行梯度洗脱复性，具体步骤见附图（这步最关键，一定要控制好流速，流速过快会导致蛋白不能正确折叠，就不能复性了，见后面的实验细节）

    详见示意图：



柱上复性示意图：B 液槽中加入 50 ml 含有 8 M 尿素的 Buffer B，A 液槽中加入 50 ml 不含尿素的 Buffer A，B 液槽中液体经过 Buffer A 的梯度稀释，经过流速控制器流入负载蛋白的柱子。

具体操作过程：首先在 A 容器中加入 50 mL Buffer A,在 B 容器中加入 50 mL Buffer B,待液面降到约 25 mL 时，补充 Buffer A 至 50 mL，到液面降到 0 mL 时，补充至 20mL，直至液面再次降到 0 mL，补充至 20 mL。整个过程控制液体流速均匀，总时间不低于 2 小时。

15. 最后用含有 20 mM磷酸、0.5 M NaCl 、0.5M 精氨酸、0.2 M 咪唑 pH 7.0 的Buffer C将蛋白洗脱下来，将所有洗脱下来的蛋白收集测A_{280}吸收。

步骤三：Intein 剪接活性与抑制检测

应用实例一： *cis*-DDP 对 intein 自剪接的抑制作用（详见文献 3）

方法一： 通过钴柱上蛋白质复性使 Intein 发生剪接

1. 接上述步骤（15），向复性后的蛋白样品（样品浓度体积调节见后面注明），加入 1~ 10 μl 0.3 mM 的 *cis*-DDP 后，反应 12 小时;

【注意】顺铂反应时间需要一定的作用时间。如果反应时间不够，顺铂不能充分反应，蛋白会在 TCEP 的诱导下进行剪接，而从荧光中看不到顺铂的抑制作用

2. 加入 5 mM EDTA 和 2 mM TCEP（最终浓度），25˚C 反应 18 h，诱导 Intein 进行自剪接，不足的体积用 Buffer C 补齐;

3. 荧光检测，GFP 的激发波长为 395 nm，在 509 nm 处有吸收峰。

方法二： 用不含尿素的 Buffer 直接稀释使 GFP-intein 蛋白复性剪接

1. 将 8M 尿素溶解的 GFP-intein 蛋白溶液（或可以在 8M urea 存在的条件下用 Co 柱纯化蛋白样品，再用咪唑梯度洗脱，分管收集蛋白样品，之后电泳鉴定，目的得到更高纯度的 GFP-intein 融合蛋白）加入 *cis*-DDP 后，反应 12 h;
2. 加入 2 mM TCEP，25˚C 反应 18 h，使 Intein 进行自剪接，不足的体积最后用 Buffer C 补齐。
3. 荧光检测，395 nm 激发，在 509 nm 处有吸收峰。。

应用实例二： 通过 GFP-intein 体系检测各种金属离子对 intein 剪接活性的抑制（参考文献 2）

方法一：通过钴柱上蛋白质复性使 Intein 发生剪接

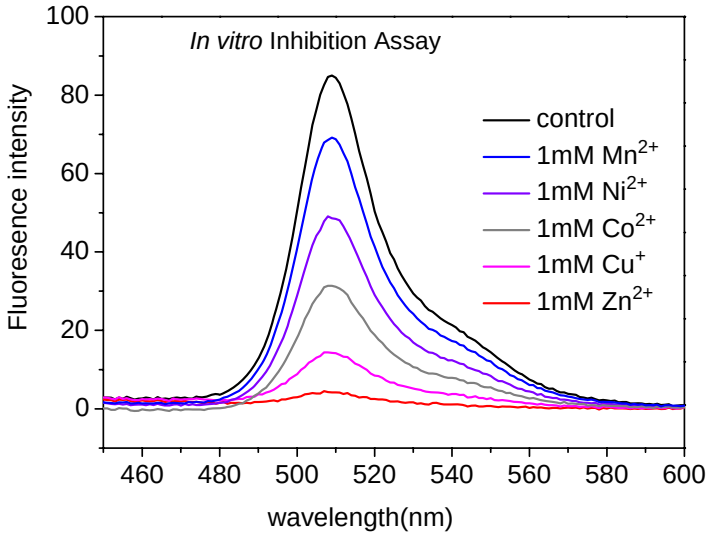
1. 向步骤 15 得到的蛋白样品中加入 5mM EDTA ，用不含咪唑的 Buffer C透析或超滤除去可以和金属离子反应的咪唑，在得到的蛋白溶液中分别加入 1 M Mn^{2+}、Co^{2+}、Ni^{2+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}和 2 mM

TCEP，25˚C 反应 18 h，诱导Intein进行自剪接，

2. 不足的体积用不含咪唑的 Buffer C 补齐

3. 荧光检测，结果见下图。

【注意】咪唑会和金属离子配位。用不含咪唑的 Buffer C（20 mM 磷酸，0.5 M NaCl，0.5 M Arginine，pH=7.0）透析或超滤除去蛋白体系中的咪唑。



方法二：用不含尿素的 Buffer 直接稀释使 GFP-intein 蛋白复性剪接

1. 在 8M urea 溶解的蛋白溶液中分别加入各种金属离子和 2 mM TCEP，不足的体积用不含咪唑的 Buffer C 补齐 (20 mM 磷酸，0.5 M NaCl，0.5 M Arginine，pH=7.0)。同时，由于 Buffer C 中不含尿素，而其中的精氨酸可以增强蛋白质的溶解度帮助蛋白在溶液中折叠，因此这个过程中融合蛋白得到复性。但如果稀释的比例太小，蛋白体系中的尿素含量过高，蛋白仍处于变性状态，不能进行剪接，因此要控制尿素的浓度，根据文献 1，蛋白体系中尿素的终浓度要在 1 M 以下，以保证蛋白复性能够正常的进行后面的剪接抑制实验

2. 荧光检测。

【注】1、荧光样品对浓度灵敏度比较高，也就是说需要的蛋白浓度不用很高。由于柱子有一定的负载量，在保证效率的同时，通常柱上上样量为 1 L 表达液中得到的蛋白样品的 1/3，最后用 15 mL 的 Buffer C 洗脱，配制荧光样品时，洗脱样品稀释 1~4 倍，如果峰的强

度过高过低，可以进行浓度调整，或稀释或浓缩，或调节荧光光栅的狭缝宽度，就可以得到合适的荧光强度。

可以根据荧光池的体积加入一定量的顺铂，通常用 250 μl 的池子，配制 300 μl 的样品，相比 1 ml 的荧光池，节省样品。

EDTA 的作用是络合掉蛋白从柱子上带下来的 Co 或 Ni。

参考文献

1. An in Vitro Screening System for Protein Splicing Inhibitors Based on Green Fluorescent Protein as an Indicator, Jaya Pal Gangopadhyay, Shu-qin Jiang,and Henry Paulus. ***Anal. Chem.*** 2003, 75, 2456-2462
2. Binding and Inhibition of Copper Ions to RecA Inteins from Mycobacterium tuberculosis, Liyun Zhang, Ning Xiao, Yan Pan, Yuchuan Zheng, Zhiyun Pan, Zhaofeng Luo, Xiaolong Xu and Yangzhong Liu. ***Chem. Eur. J.*** 2010, 16, 4297 – 4306
3. Cisplatin Inhibits Protein Splicing, Suggesting Inteins as Therapeutic Targets in Mycobacteria，Liyun Zhang, Yuchuan Zheng, Brian Callahan, Marlene Belfort, and Yangzhong Liu，***J. Biol. Chem***. *2011*, 286,1277–1282