

本文引用格式:鞠金鑫,马林,李琳,等. 铜离子对光合颤绿菌蓝铜蛋白结晶的影响[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2025, 38(2):299-306.

Citation format:JU Jinxin, MA Lin, LI Lin, et al. The impact of copper ions on the crystallization of auracyanin from *Candidatus Viridilinea Medisalina*[J]. Journal of Liaocheng University (Natural Science Edition), 2025, 38(2):299-306.

文章编号 1672-6634(2025)02-0299-08

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2024090015

铜离子对光合颤绿菌蓝铜蛋白结晶的影响

鞠金鑫,马林,李琳,董士尚,秦晓春

(济南大学 生物科学与技术学院,山东 济南 250022)

摘要 蓝铜蛋白(auracyanin, AC)是一种含铜的重要光合电子传递载体。分别获得高质量的光合颤绿菌(*Candidatus Viridilinea mediisalina*, Cvm)野生型 AC 蛋白(Cvm-AC)和不结合铜离子的突变体 AC 蛋白(Cvm-AC-mutant),通过对比两者结晶条件的差异探讨铜离子对 Cvm-AC 蛋白结晶的影响。首先通过异源表达获得两种目的蛋白,再分别依次通过镍离子亲和层析、阴离子交换柱层析和凝胶过滤层析分离纯化获得高纯度的 Cvm-AC 和 Cvm-AC-mutant 蛋白,并使用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳对蛋白的均一性和纯度进行检测;通过使用坐滴法和悬滴法对 Cvm-AC 蛋白的结晶条件进行筛选和优化,最终获得了质量较好的 Cvm-AC 蛋白晶体。然而,使用 Cvm-AC 蛋白的结晶条件无法获得 Cvm-AC-mutant 的蛋白质晶体,表明铜离子的结合与否可以直接影响 Cvm-AC 的结晶。

关键词 光合颤绿菌; Cvm-AC 蛋白; 分离; 纯化; 结晶

中图分类号 Q936

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



The Impact of Copper Ions on the Crystallization of Auracyanin from *Candidatus Viridilinea Medisalina*

JU Jinxin, MA Lin, LI Lin, DONG Shishang, QIN Xiaochun

(School of Biological Science and Technology, University of Jinan, Jinan 250022, China)

Abstract The auracyanin (AC) is an important copper-containing photosynthetic electron transport carrier. The high quality of the (*Candidatus Viridilinea mediisalina*, Cvm) AC protein (Cvm-AC) and mutant AC protein (Cvm-AC-mutant) were obtained, and the effect of copper ion on the crystallization of Cvm-AC protein was further explored by comparing the differences in crystallization conditions between the two. Firstly, we obtained two target proteins by heterologous, and then isolated and purified the high-purity Cvm-AC and Cvm-AC-mutant proteins by nickel-ion affinity chromatography, anion-exchange column chromatography, and gel filtration chromatography, respectively, and examined the homogeneity and purity of the proteins by using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The crystalliza-

收稿日期:2024-09-30

基金项目:国家自然科学基金项目(32070267,32270260);山东省自然科学基金重大基础研究项目(ZR2019ZD48);国家自然科学基金项目(32200206);山东省自然科学基金项目(ZR2020QC057)资助

通信作者:秦晓春,女,汉族,博士,教授,博士生导师,研究方向:光合作用与高光效农业,E-mail: bio_qinxc@ujn.edu.cn;
董士尚,男,汉族,博士,副教授,研究方向:生物大分子的结构与功能,E-mail: bio_dongss@ujn.edu.cn.

tion conditions for Cvm-AC protein were screened and optimized using the sitting drop method and the hanging drop method, ultimately yielding high-quality Cvm-AC protein crystals. However, the crystallization conditions for Cvm-AC protein could not yield protein crystals for Cvm-AC-mutant, indicating that the binding of copper ions can directly affect the crystallization of Cvm-AC.

Key words *Candidatus Viridilinea mediisalina*; Cvm-AC protein; separation; purification; crystallization

0 引言

光合作用被誉为地球上最重要的化学反应,它不仅发生于绿色植物和藻类中,也发生在光合细菌中^[1]。在光合作用光反应阶段,光合生物的天线蛋白-色素复合物吸收光能并将其传递给光反应中心的(细菌)叶绿素特殊对,继而产生电荷分离和能量转换。因此,在光合生物中,光能的利用始终伴着电子的传递过程^[2-4]。

在绿弯菌门中可进行光合作用的细菌主要分布于绿弯菌属、玫瑰弯菌属、绿丝菌属、螺丝菌属和颤绿菌属,通常人们将它们统称为丝状不产氧光合细菌(filamentous anoxygenic phototrophs, FAPs)^[5,6]。与绿色植物和蓝细菌不同,在 FAPs 中,氢醌的氧化是由一种称为 ACIII(Alternative Complex III)的细胞色素 bc_1/b_6f 复合体的替代物完成。氢醌经 ACIII 氧化后释放电子,电子经周质空间侧的蓝铜蛋白(Auracyanin, AC),最终传递给光反应中心,完成电子的循环传递^[7]。

AC 蛋白是一种具有保守金属离子结合域的重要光合电子传递载体,其广泛存在于植物和细菌中^[8-11]。目前,绿弯菌属以及玫瑰弯菌属 AC 蛋白的三维空间结构均已获得解析,结构上,两种 AC 蛋白具有十分相似的铜离子结合口袋,但其蛋白的表面特征却明显不同^[12,13]。与之相比,同属于绿弯菌门的颤绿菌属 AC 蛋白的结构以及功能研究的报道却相对较少^[14,15]。

本文选取光合颤绿菌(*Candidatus Viridilinea mediisalina*, Cvm)中结合铜离子的蓝铜蛋白为研究对象,采用大肠杆菌异源表达方式分别制备野生型(简称 Cvm-AC)和突变体 Cvm-AC 蛋白(通过与 Cvm-AC 同源的绿弯菌属以及玫瑰弯菌属 AC 蛋白的分析比较,可知 Cvm-AC 的铜离子结合位点为 H78, C143, H148 和 M152^[12,13],分别将该四个氨基酸残基突变为甘氨酸残基,使其无法与铜离子结合,获得的突变体简称为 Cvm-AC-mutant),并通过分离、纯化获得均一性较好、纯度较高的蛋白样品。通过对 Cvm-AC 蛋白的结晶筛选与优化,获得较高质量的 Cvm-AC 蛋白质晶体,并利用已经获得的 Cvm-AC 结晶条件,尝试获得 Cvm-AC-mutant 的蛋白质晶体,探讨铜离子对 Cvm-AC 蛋白结晶的影响,同时也为深入理解绿弯菌门不同属内 AC 蛋白的结构及功能差异提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、基因与引物。大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)DH5 α 菌株和 BL21(DE3)购自于北京博迈德基因技术有限公司;pET28a 质粒购自于美国赛默飞世尔科技公司;Cvm-AC 基因和 pET28a-Cvm-AC-mutant 表达载体购自于苏州金唯智生物科技有限公司,引物由青岛擎科生物科技有限公司合成,Cvm-AC 的上游引物:5'-CATGCCATGGGCGGCAACGGCAAC-3',下游引物:5'-CCCTCGAGTTCTTCCAC-CACCAGAC-3'。

1.1.2 主要试剂与材料。快速质粒小提试剂盒与琼脂糖凝胶脱氧核糖核酸(DNA)回收试剂盒,购自北京天根生化科技有限公司;T4 DNA 连接酶、*Nco* I 以及 *Xho* I,购自美国赛默飞世尔科技公司;高保真 DNA 聚合酶 Prime STAR Max,购自大连宝生物工程有限公司;蛋白分子量标示物,购自上海雅酶生物医药科技有限公司;镍离子亲和层析柱(Ni-NTA)、SuperdexTM 75 和 Q HP 阴离子交换柱凝胶过滤层析柱,购自美国通用电气公司;超滤离心管,购自德国默克密理博公司;IndexTM、Cystal ScreenTM、Cystal ScreenTM 2、PEG/Ion ScreenTM、PEG/Ion 2 ScreenTM、SaltRxTM 1 和 SaltRxTM 2 结晶筛选试剂盒,购自美国 Hampton Research 公司。

1.1.3 主要仪器。PCR 扩增仪,Long Gene 公司;Centrifuge 5417R 高速冷冻离心机,ependorf 公司;GXZ 型智能培养箱,上海知楚有限公司;低温恒温培养箱,日本 Panasonic 公司;Avanti J-26S XP 型高速离心机,美国贝克曼库尔特公司;电热恒温振荡水浴锅上海精宏设备厂;UVP 凝胶成像系统英国 UVP 公司;琼脂糖凝胶电泳仪 Tanon 公司;JH-02 HC 型高压匀质机,广州聚能纳米生物科技股份有限公司;ÄKTA pure25 L1 型蛋白纯化系统,美国通用电气公司;NanoDrop 型微量紫外-可见分光光度计,美国赛默飞公司。

1.2 方法

1.2.1 蛋白的原核表达载体构建。Cvm-AC 蛋白共由 160 个氨基酸残基组成,通过与绿弯菌属以及玫瑰弯菌属 AC 蛋白的氨基酸序列同源性比对发现,Cvm-AC 蛋白第 1~23 位氨基酸残基为转运信号序列^[12,13],故根据合成的基因序列仅扩增 Cvm-AC 蛋白第 24~160 位氨基酸残基所对应的基因。采用 Prime STAR Max 的标准反应体系进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR),扩增条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min(其中,变性、退火和延伸共进行 32 个循环)。经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物,并利用 DNA 凝胶回收试剂盒回收大小约为 412 bp 的条带(Cvm-AC 蛋白 DNA 片段大小为 412 bp)。随后,将 PCR 产物与 pET28a 空载体分别使用 *Nco* I 和 *Xho* I 两种限制性内切酶进行双酶切,得到线性化的 pET28a 和 Cvm-AC 基因。接着,使用 T4 DNA 连接酶,将 pET28a 和 Cvm-AC 基因在室温(25 °C)下连接 3 h。连接反应结束后,将重组质粒转化入 DH5 α 感受态细胞,并涂布于含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 Luria Bertani(LB)平板上 37 °C 过夜培养。次日,筛选阳性菌株并进行扩大培养后提取质粒,经双酶切鉴定后,将 pET28a-Cvm-AC 重组质粒送至青岛擎科生物科技有限公司进行测序鉴定。

1.2.2 蛋白的诱导表达。将测序鉴定正确的 pET28a-Cvm-AC 重组质粒和生物公司合成并构建成功的 pET28a-Cvm-AC-mutant 表达载体分别转化至 BL21(DE3)大肠杆菌感受态细胞中,并涂布到含有卡那霉素的 LB 固体培养基平板上,获得了分别含有 pET28a-Cvm-AC 和 pET28a-Cvm-AC-mutant 的重组大肠杆菌 BL21(DE3)阳性转化子。将其单菌落分别接种至 5 mL LB 液体培养基中,并在 37 °C、220 r/min 条件下过夜培养,得到种子培养物。次日,将种子培养物接种至 800 mL LB 液体培养基中,并培养至密度值(OD₆₀₀)约为 0.6~0.8,取 200 μ L 菌液,标记为诱导前样品。随后,向剩余培养物中加入 400 μ L 浓度为 1.0 mol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达 16 h,再次取 200 μ L 菌液,并标记为诱导后样品。最后,分别将诱导前样品和诱导后样品在 100 °C 煮沸 10 min 后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测。

1.2.3 镍离子亲和层析。诱导 16 h 后,将大肠杆菌培养物以 6 000 r/min 的速度在 4 °C 条件下进行高速离心,收集沉淀并用收菌缓冲液(20 mmol/L HEPES,pH 值为 7.0,甘油体积分数为 5%,氯化钠浓度为 500 mmol/L)悬浮菌体,获得大肠杆菌菌液。菌液经过高压匀质破碎 5 次后,12 000 r/min 离心 0.5 h,收集上清液。将上清液与预先使用收菌缓冲液平衡好的镍离子亲和层析介质混合,并在 4 °C 条件下孵育 2 h。随后,使用含有低浓度咪唑的除杂缓冲液进行洗杂,首先用含 25 mmol/L 咪唑的除杂缓冲液(20 mmol/L HEPES,pH 值为 7.0,甘油体积分数为 5%,氯化钠浓度为 500 mmol/L,咪唑浓度为 25 mmol/L)洗杂三次,然后用含 50 mmol/L 咪唑的除杂缓冲液(20 mmol/L HEPES,pH 值为 7.0,甘油体积分数为 5%,氯化钠浓度为 500 mmol/L,咪唑浓度为 50 mmol/L)洗杂一次。最后,使用镍离子层析洗脱液(20 mmol/L HEPES,pH 值为 7.0,甘油体积分数为 5%,氯化钠浓度为 500 mmol/L,咪唑浓度为 500 mmol/L)洗脱目的蛋白,并进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.4 阴离子交换柱层析纯化。首先,将镍离子层析洗脱得到的蛋白样品倒入预冷的 10 ku 浓缩管中,在 4 °C、4 500 r/min 条件下进行离心浓缩,直至蛋白体积降至 1 mL。然后向浓缩管的样品中加入等体积的低盐缓冲液(HEPES 浓度为 20 mmol/L,pH 7.0,氯化钠浓度为 200 mmol/L,甘油体积分数为 5%)进行液体置换,重复此步骤 4 次。接着,向浓缩后的蛋白样品中加入等体积的 A 液(HEPES 浓度为 20 mmol/L,pH 7.0,氯化钠浓度为 20 mmol/L,甘油体积分数为 5%),再次进行离心浓缩至样品体积为 1 mL,重复此步骤 4 次。最后,使用 ÄKTA 蛋白纯化系统进行阴离子交换柱层析。其中,洗脱过程中,设置参数,使得在 60 min

内将氯化钠浓度从 20 mmol/L 线性提高至 1.0 mol/L。收集与蛋白峰相对应的洗脱液样品,并进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.5 凝胶过滤层析纯化。预先用凝胶过滤层析缓冲液(HEPES 的浓度为 20 mmol/L,pH 7.0,氯化钠的浓度为 300 mmol/L)平衡层析柱 Superdex™ 75,随后将经阴离子交换柱层析纯化后所得的蛋白样品浓缩并换液至凝胶过滤层析缓冲液中。设置体积流速为 0.5 mL/min,上限压强为 2.0 MPa,进行凝胶过滤层析,收集目的蛋白。最后用 SDS-PAGE 检测层析获得的目的蛋白,并将目的蛋白浓缩后用 NanoDrop 微量紫外-可见分光光度计进行浓度测定。分别获得高纯度的 Cvm-AC 和 Cvm-AC-mutant 蛋白。

1.2.6 Cvm-AC 蛋白结晶条件的筛选与优化。采用坐滴法对 Cvm-AC 蛋白样品的结晶条件进行初步筛选,筛选所选用的蛋白质溶液质量浓度为 20.0 g/L,结晶温度为 16 ℃,池液与蛋白质溶液按照体积比 1:1 混合,结晶试剂盒为 Index™、Crystal Screen™、Crystal 2 Screen™、PEG/Ion Screen™ 和 PEG/Ion 2 Screen™(共计 288 种条件)。通过显微镜观察,选取体积较大、形状较为规则的晶体所对应的结晶条件进行后续优化,即分别对 Cvm-AC 蛋白晶体生长的蛋白质浓度,生长池液的沉淀剂浓度、缓冲试剂 pH 和种类以及晶体生长所需的温度等进行调整,获得体积和形状更佳的 Cvm-AC 蛋白质晶体。

1.2.7 Cvm-AC-mutant 蛋白的结晶。分别使用 Cvm-AC 蛋白的初筛条件和优化后条件对 Cvm-AC-mutant 蛋白进行结晶,以期获得 Cvm-AC-mutant 的蛋白质晶体。

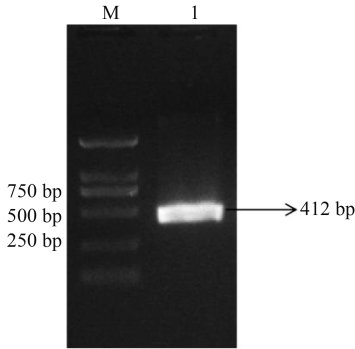
2 实验结果与分析

2.1 Cvm-AC 目的基因的扩增及原核表达载体构建

图 1 为 Cvm-AC 基因的聚合酶链式反应(PCR)琼脂糖凝胶电泳图。蛋白基因长度为 412 bp,图 1 中条带位置符合目的基因长度,证明 RCR 扩增成功。重组后的表达载体 pET28a-Cvm-AC 经测序后发现与目的基因序列一致,可进行后续实验。Cvm-AC-mutant 基因合成及 pET28a-Cvm-AC-mutant 重组表达载体构建是由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

2.2 重组蛋白的诱导表达

Cvm-AC 和 Cvm-AC-mutant 蛋白的 SDS-PAGE 检测结果分别如图 2(a)和 2(b)所示。由图可以看出,相较于诱导前样,诱导后样在 10 ku 和 15 ku 之间(目的蛋白的理论分子量 14.4 ku)的蛋白条带明显变粗,表明 Cvm-AC 和 Cvm-AC-mutant 蛋白在该条件下均可诱导表达。

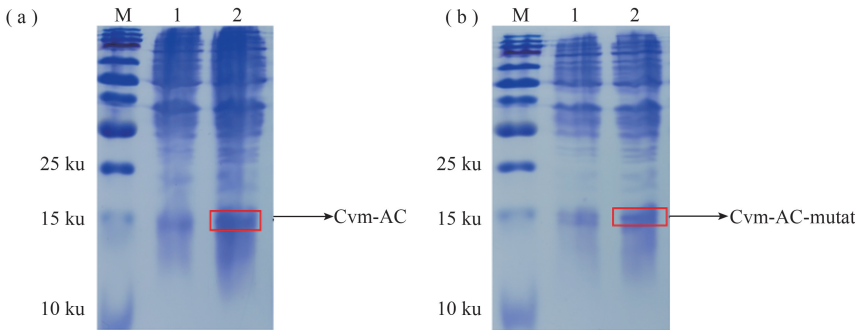


注:M—基因标示物;1—Cvm-AC 蛋白基因。

Note: M—Gene marker; 1—The gene of Cvm-AC.

图 1 Cvm-AC 蛋白基因 PCR 后的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis after PCR of Cvm-AC gene



注:M—蛋白标示物;1—诱导前样;2—诱导后样;目的蛋白位置如图中红框所示。

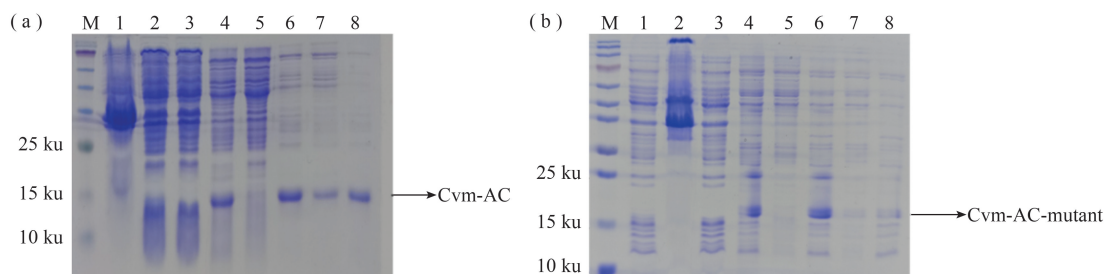
Note: M—Protein marker; 2—Induced sample; the location of the target protein is indicated by the red box in the figure.

图 2 重组蛋白诱导前后 SDS-PAGE 图(a)Cvm-AC 蛋白的 SDS-PAGE 图;(b)Cvm-AC-mutant 蛋白的 SDS-PAGE 图

Fig. 2 SDS-PAGE of recombinant protein before and after induction (a) SDS-PAGE of Cvm-AC protein; (b) SDS-PAGE of Cvm-AC-mutant protein

2.3 镍离子亲和层析纯化结果

Cvm-AC 和 Cvm-AC-mutant 蛋白经镍离子亲和层析纯化后的各组分的 SDS-PAGE 检测结果分别如图 3(a)和 3(b)所示。由图可知在 25 mmol/L 和 50 mmol/L 咪唑的作用下,大部分杂质蛋白被洗下,洗后的镍离子亲和层析柱中所含 Cvm-AC 蛋白和 Cvm-AC-mutant 蛋白纯度较高,但仍存在少量杂质,需进行进一步的分离纯化。



注: M—蛋白标示物; 1—破菌后离心所得沉淀; 2—破菌后离心所得上清; 3—镍离子介质与上清亲和以后的流穿; 4—亲和以后的镍离子介质; 5—25 mmol/L 咪唑洗杂后的流穿; 6—25 mmol/L 咪唑洗杂后的镍离子介质; 7—50 mmol/L 的咪唑洗杂后的流穿; 8—50 mmol/L 咪唑洗杂完以后的镍介质。

Note: M—Protein marker; 1—The pellet obtained after centrifugation following bacterial lysis; 2—The supernatant obtained after centrifugation following bacterial lysis; 3—The flow-through after affinity chromatography with the supernatant on a nickel ion medium; 4—The nickel ion medium after affinity chromatography; 5—The flow-through after washing with 25 mmol/L imidazole; 6—The nickel ion medium after washing with 25 mmol/L imidazole; 7—The flow-through after washing with 50 mmol/L imidazole; 8—The nickel ion medium after washing with 50 mmol/L imidazole.

图3 镍离子亲和层析纯化过程各组分的 SDS-PAGE 图(a)Cvm-AC 蛋白 SDS-PAGE 图;(b)Cvm-AC-mutant 蛋白 SDS-PAGE 图

Fig. 3 The SDS-PAGE images of various components during the purification process of nickel ion affinity chromatography

(a) SDS-PAGE of Cvm-AC protein; (b) SDS-PAGE of Cvm-AC-mutant protein

2.4 阴离子交换柱层析纯化结果

将 Cvm-AC 和 Cvm-AC-mutant 蛋白浓缩换液后分别进行阴离子交换柱层析,结果如图 4(a)和 4(b)所示,图中曲线为 280 nm 处的吸收值。绝大部分 Cvm-AC 和 Cvm-AC-mutant 蛋白已经结合到阴离子交换柱,且在整个层析过程均仅出现 1 个主要吸收峰,说明两种蛋白所带电荷均较为均一。

将所出峰对应样品进行 SDS-PAGE 检测,结果如图 5(a)和 5(b)所示,出峰所对应的蛋白分子量与目的蛋白单体理论分子量相符,表明获得了纯度相对较高的 Cvm-AC 和 Cvm-AC-mutant 蛋白样品。

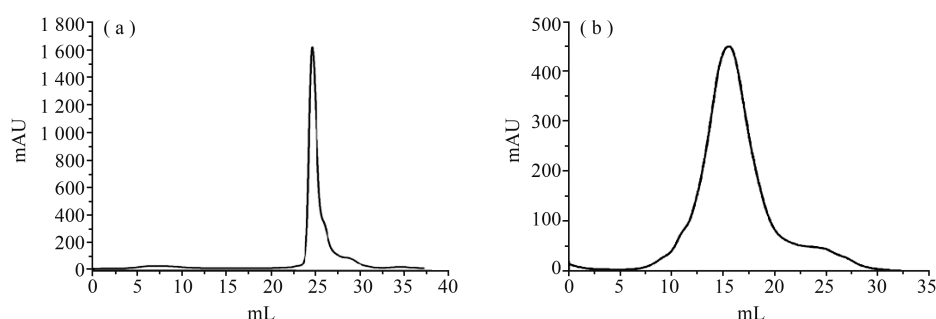


图4 阴离子交换柱层析图(a) Cvm-AC 蛋白阴离子交换柱层析图;(b) Cvm-AC-mutant 蛋白阴离子交换柱层析图

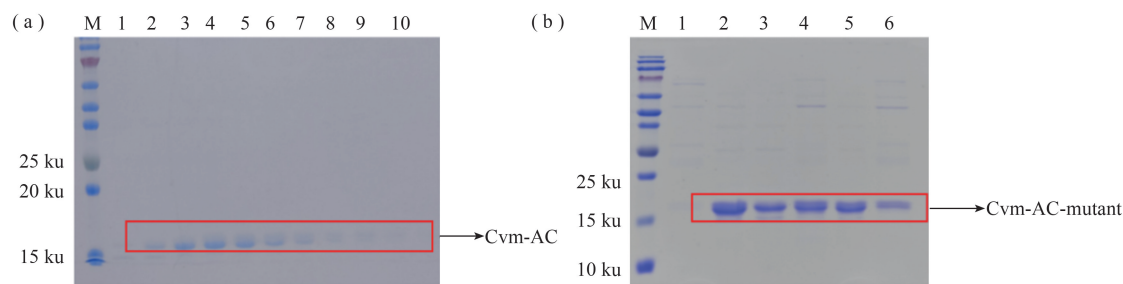
Fig. 4 Anion exchange column chromatography diagram (a) Anion-exchange column chromatography diagram of Cvm-AC protein; (b) Anion-exchange column chromatography diagram of Cvm-AC-mutant protein

2.5 凝胶过滤层析结果

利用凝胶过滤层析对 Cvm-AC 和 Cvm-AC-mutant 蛋白的聚集状态及分子量进行评判。将阴离子交换层析纯化后的 Cvm-AC 和 Cvm-AC-mutant 蛋白溶液继续浓缩并更换溶液至凝胶过滤层析缓冲液中,分别使用 Superdex™ 75 进行进一步的纯化,结果如图 6(a)和 6(b)所示,图中曲线为 280 nm 处的吸收值。

根据 Superdex™ 75 的工作原理,如果目的蛋白为单体形式存在,则应在洗脱体积 13 mL 之后出现目的

蛋白吸收峰, Cvm-AC 洗脱体积 13.3 mL, 说明 Cvm-AC 蛋白以单体形式存在。此外, 在整个层析过程仅出现 1 个主要吸收峰, 表明 Cvm-AC 蛋白均一性良好。收集目的蛋白并经超滤管浓缩后, 使用 NanoDrop 微量紫外-可见分光光度计进行浓度测定并稀释至质量浓度为 35 g/L 后于液氮速冻, 置于 -80°C 冰箱中保存备用。



注: M—蛋白标示物。 Note: M—Protein marker

图 5 阴离子交换层析对应的 SDS-PAGE 图 (a) Cvm-AC 蛋白经阴离子交换层析后的蛋白洗脱峰对应的 SDS-PAGE 图; (b) Cvm-AC-mutant 蛋白经阴离子交换柱层析后的蛋白洗脱峰对应的 SDS-PAGE 图

Fig. 5 Anion-exchange chromatography corresponding SDS-PAGE image (a) The SDS-PAGE corresponding to the protein elution peak after anion-exchange chromatography of Cvm-AC protein; (b) The SDS-PAGE corresponding to the protein elution peak after anion-exchange chromatography of Cvm-AC-mutant protein

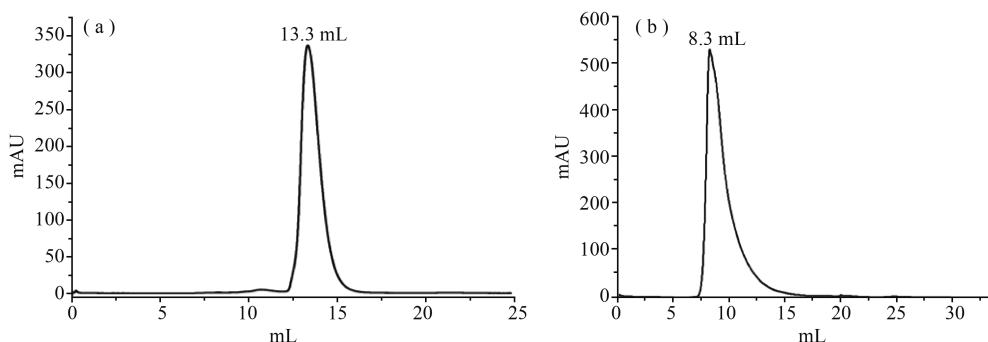


图 6 凝胶过滤层析图 (a) Cvm-AC 蛋白 SuperdexTM 75 凝胶过滤层析图; (b) Cvm-AC-mutant 蛋白 SuperdexTM 75 凝胶过滤层析图

Fig. 6 Gel filtration chromatography diagram (a) The gel filtration chromatography diagram of Cvm-AC protein using SuperdexTM 75; (b) The gel filtration chromatography diagram of Cvm-AC-mutant protein using SuperdexTM 75

而 Cvm-AC-mutant 的蛋白的出峰位置在 8.3 mL, 远大于分子筛的极限排阻, 故 Cvm-AC-mutant 是以多聚体形式存在, 使用 NanoDrop 微量紫外-可见分光光度计进行浓度测定并稀释至质量浓度为 35 g/L 后液氮速冻, 置于 -80°C 冰箱中保存备用。

2.6 Cvm-AC 蛋白结晶条件初筛与优化

利用多种蛋白结晶试剂盒对 Cvm-AC 蛋白进行结晶条件的初步筛选, 结果发现 Cvm-AC 蛋白在 4 种 (IndexTM 的 26 号、IndexTM 的 66 号、SaltRXTM 的 1 号、Crystal screen 的TM 4 号) 条件下均可以长出晶体, 具体条件如表 1 所示。

对选定的 4 种结晶池液分别采用悬滴法进行优化。通过对 Cvm-AC 蛋白的浓度、结晶 pH、沉淀剂浓度进行多轮的优化后发现, IndexTM 的 26 号条件、IndexTM 的 66 号条件、SaltRXTM 的 1 号条件的优化效果较差, Cvm-AC 蛋白晶体的形状以及大小均未得到改善, 后续仅选定池液名称为 Crystal screenTM 的 4 号条件的结晶条件进行优化, 如图 7(a)。

具体优化结晶条件如: 蛋白质量浓度为: 20、35 g/L; 结晶温度为: 4、16 和 20 $^{\circ}\text{C}$; 硫酸铵的浓度为: 1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、3.0、3.2 mol/L; pH 值为: 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5。针对上述不同变量, 每次仅改变其中一个进行优化。经过多次优化, 最后在 Cvm-AC 蛋白浓度为 35 g/L, 结晶温度为 16 $^{\circ}\text{C}$, 池液中硫酸铵浓度为 2.0 mol/L, 三羟甲基氨基甲烷的浓度为 0.1 mol/L, pH 为 8.5 的条件下可获得了体积较大、形状较为规则的 Cvm-AC 晶体, 如图 7(b)。

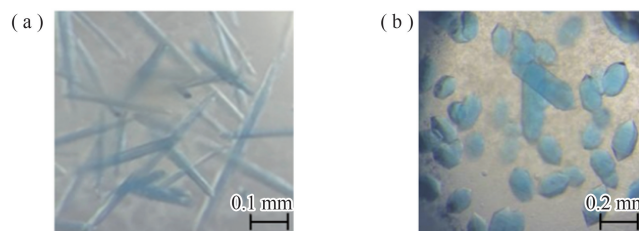


图 7 Cvm-AC 蛋白晶体优化前后图 (a)Crystal screen™ 的第 4 号条件优化前图;(b)Crystal screen™ 的第 4 号条件优化后图

Fig. 7 The crystal optimization before and after images of Cvm-AC protein (a) The image before optimizing Cvm-AC protein with condition number 4 of Crystal Screen™ (b) The image after optimizing Cvm-AC protein with condition number 4 of Crystal Screen™

2.7 Cvm-AC-mutant 蛋白的结晶

通过多次尝试,Cvm-AC-mutant 蛋白在 Index™ 的 26 号、Index™ 的 66 号、SaltRX™ 的 1 号、Crystal screen™ 的 4 号以及优化后的 Crystal screen™ 的 4 条件下均未长出结晶。

表 1 Cvm-AC 蛋白初筛结晶生长条件

Tab. 1 The initial screening of crystallization growth conditions for Cvm-AC protein

池液名称	条件组成
Index™ 的 26 号	酒石酸氢氨浓度为 1.1 mol/L,pH 7.5
SaltRX™ 的 1 号	硫酸铵浓度为 3.2 mol/L,双(2 羟乙基)氨基(三羟甲基)的浓度为 0.1 mol/L,pH 5.5
Crystal screen™ 的 4 号	硫酸铵浓度为 2.0 mol/L,三羟甲基氨基甲烷的浓度为 0.1 mol/L,pH 8.5
Index™ 的 66 号	硫酸铵浓度为 0.2 mol/L,双(2 羟乙基)氨基(三羟甲基)的浓度为 0.1 mol/L,pH 5.5,聚乙二醇的体积分数为 2%

3 结论与讨论

在 FAPs 光合电子传递过程中,AC 蛋白发挥着重要的电子载体作用^[16-18],其三维空间结构特征对于理解光合生物电子传递机理以及生物仿生学的研究具有十分重要的意义。

本研究通过 PCR、载体构建获得了 pET28a-Cvm-AC 重组表达载体;并经大肠杆菌异源表达、亲和层析以及凝胶过滤层析纯化获得了纯度较高的 Cvm-AC 和 Cvm-AC-mutant 蛋白;纯化后的 Cvm-AC 蛋白经晶体筛选与优化,获得了体积相对较大、形状较规则的晶体。优化后的具体条件为:培养温度为 16 ℃,蛋白的质量浓度为 35.0 g/L,池液中硫酸铵浓度为 2.0 mol/L,三羟甲基氨基甲烷的浓度为 0.1 mol/L,pH 8.5。而在纯化过程中我们发现 Cvm-AC-mutant 蛋白为多聚体状态,其聚集形式明显区别于 Cvm-AC 蛋白的单体形式。此外,结晶实验发现,在 Cvm-AC 蛋白结晶条件下 Cvm-AC-mutant 蛋白均未能结晶。表明铜离子的缺失可能影响了 Cvm-AC 蛋白的三维空间结构和功能,导致其在溶液状态中的聚集状态发生改变,从而影响到了蛋白质的结晶。

本研究明确了铜离子对 Cvm-AC 的结构、聚集状态以及结晶情况均存在重要的影响,目前的研究结果为理解铜离子在 Cvm-AC 蛋白中的关键作用以及开展针对 Cvm-AC 三维空间结构的研究奠定了重要基础。

参 考 文 献

- [1] XIONG J, FISCHER W M, INOUE K, et al. Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis[J]. Science, 2000, 289 (5485): 1724-1730.
- [2] PIERSON B K, CASTENHOLZ R W. A phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, Chloroflexus aurantiacus, gen. and sp. nov[J]. Archives of Microbiology, 1974, 100(1): 5-24.
- [3] YAMAGUCHI T, TABOROSI A, SAKAI C, et al. Systematic elucidation of the second coordination sphere effect on the structure and properties of a blue copper protein, pseudoazurin[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2023, 246: 112292.
- [4] MAMMOSER C C, AGH E R, GARCIA M N, et al. Altered coordination in a blue copper protein upon association with redox partner revealed by carbon-deuterium vibrational probes[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2022, 24: 21588-21592.

- [5] XIAN W, ZHANG X, LI W. Research status and prospect on bacterial phylum Chloroflexi[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(9): 1801-1820.
- [6] ROZANOV A S, BRYANSKAYA A V, IVANISENKO T V, et al. Biodiversity of the microbial mat of the Garga hot spring[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2017, 17(2): 254.
- [7] ZHANG Y, YU X, TIAN G, et al. First-principles study on the structure and optical spectroscopy of the redox-active center of blue copper proteins[J]. *Chemical Physics*, 2020, 537: 110859.
- [8] CAMPBELL G A, SCHWIENSTEK P, VISHNIVETSKAYA T, et al. Diversity and genomic insights into the uncultured Chloroflexi from the human microbiota[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(9): 2635-2643.
- [9] MADIGAN M T, BROCK T D. Photosynthetic sulfide oxidation by *Chloroflexus aurantiacus*, a filamentous, photosynthetic, gliding bacterium[J]. *Journal of Bacteriology*, 1975, 122(2): 782-784.
- [10] ZHANG Y, YU X, TIAN G, et al. First-principles study on the structure and optical spectroscopy of the redox-active center of blue copper proteins[J]. *Chemical Physics*, 2020, 537: 110859.
- [11] FUKUDA Y, LINTULUOTO M, KURIHARA K, et al. Overlooked hydrogen bond in a blue copper protein uncovered by neutron and sub-Ångström resolution X-ray crystallography[J]. *Biochemistry*, 2024, 63(3): 339-347.
- [12] LEE M, DEL ROSARIO M C, HARRIS H H, et al. The crystal structure of auracyanin A at 1.85 Å resolution: the structures and functions of auracyanins A and B, two almost identical “blue” copper proteins, in the photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus* [J]. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2009, 14(3): 329-345.
- [13] WANG C, XIN Y, MIN Z, et al. Structural basis underlying the electron transfer features of a blue copper protein auracyanin from the photosynthetic bacterium *Roseiflexus castenholzii*[J]. *Photosynthesis Research*, 2020, 143: 301-314.
- [14] PIERSON B K, CASTENHOLZ R W. Bacteriochlorophylls in gliding filamentous prokaryotes from hot springs[J]. *Nature New Biology*, 1971, 233(35): 25-27.
- [15] BLAZEJAK A, SCHIPPERS A. High abundance of JS-1- and Chloroflexi-related Bacteria in deeply buried marine sediments revealed by quantitative, real-time PCR[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 72(2): 198-207.
- [16] NEMOTO F, KOJIMA H, FUKUI M. Diversity of freshwater thioploca species and their specific association with filamentous bacteria of the phylum chloroflexi[J]. *Microbial Ecology*, 2011, 62(4): 753-764.
- [17] GAISIN V A, KALASHNIKOV A M, GROUZDEV D S, et al. *Chloroflexus islandicus* sp. nov., a thermophilic filamentous anoxygenic phototrophic bacterium from a geyser[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2017, 67(5): 1381-1386.
- [18] WASMUND K, ALGORA C, MÜLLER J, et al. Development and application of primers for the class Ehalococcoidia (phylum Chloroflexi) enables deep insights into diversity and stratification of subgroups in the marine subsurface[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(10): 3540-3556.

(责任编辑:刘庆松)

(上接第 258 页)

- [18] 康佳, 任少卿, 吕科, 等. 2:17 型钕钴永磁体的粉料粒度及固溶处理对 HK 影响的研究[J/OL]. *中国稀土学报*, 1-18. [2024-08-21]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2365.TG.20240326.1426.002.html>.
- [19] 张茂彩, 崔红兵, 王誉, 等. 混料方式对钕铁硼磁粉的流动性和磁体性能的影响[J]. *中国稀土学报*, 2024, 42(4): 712-718.
- [20] 刘涛, 李瑞雨, 周磊, 等. 烧结钕铁硼磁体矫顽力提升技术研究进展[J/OL]. *中国稀土学报*, 1-19. [2024-08-21]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2365.TG.20240119.1234.002.html>.
- [21] MATSUURA Y, HOSHIJIMA J, ISHII R. Relation between Nd₂Fe₁₄B grain alignment and coercive force decrease ratio in NdFeB sintered magnets[J]. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2013, 336: 88-92.
- [22] NI J J, MA T Y, CUI X G, et al. Improvement of corrosion resistance and magnetic properties of Nd-Fe-B sintered magnets by Al₈₅Cu₁₅ intergranular addition[J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2010, 502(2): 346-350.
- [23] 倪俊杰, 王永康, 贾正锋, 等. Cu₈₅Sn₁₅ 晶界添加对 NdFeB 磁性及抗蚀性的影响[J]. *稀有金属材料与工程*, 2016, 45(8): 2111-2115.
- [24] 李红英, 郝壮志, 刘宇晖, 等. 烧结 NdFeB 永磁体的腐蚀行为[J]. *稀有金属材料与工程*, 2018, 47(5): 1451-1458.
- [25] CAO Y J, LIU Y H, ZHANG P J, et al. Corrosion resistance and mechanical properties of (Ho,Nd)FeB magnets[J]. *Journal of Rare Earths*, 2021, 39: 1409.

(责任编辑:蒲锡鹏)