

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.02.014

CAT2 和 NCA1 的原核共表达中 CAT2 酶活性质研究

张瑞含¹, 韩毅²

(1. 合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601; 2. 安徽农业大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230036)

摘要:植物过氧化氢酶 2(CAT2)是控制植物体内氧化还原水平、调控过氧化氢信号传递的关键酶。在植物体内 NCA1 是 CAT2 重要的分子伴侣,可以保护 CAT2 不被降解并发挥其正常功能。在目前的原核表达研究中,大部分研究仅单独表达了 CAT2 蛋白。文章利用拟南芥 CAT2 和 NCA1 基因的全编码序列构建了原核表达载体 pMAL-p2x-CAT2 和 PET28a(+)-NCA1,转入同一大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3)后,共表达成功获得了存在于破细胞后上清液内的 CAT2 蛋白。通过对相关酶学性质的研究,发现 CAT2 的最适温度为 20 ℃,最适 pH 值为 8,酶活高达 580 U/mg,是单独表达 CAT2 酶活的 5 倍,蛋白质质量浓度为 0.42 μg/μL。NO 是植物体内一种可以对蛋白进行亚硝基化修饰的信号分子,在成功表达出 CAT2 基础上利用 NO 供体亚硝基谷胱甘肽(GSNO)进行处理,发现 NO 处理后 CAT2 的酶活受到抑制,利用还原剂二硫苏糖醇(DTT)处理后可以使酶活恢复,推测 NO 可能通过亚硝基化修饰 CAT2 调控其酶活力,从而间接地影响细胞内环境的状态。

关键词:过氧化氢酶; NCA1 基因; 原核表达; 一氧化碳; 亚硝基化

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1003-5060(2025)02-0236-05

Enzyme activity of CAT2 in prokaryotic co-expression of CAT2 and NCA1

ZHANG Ruihan¹, HAN Yi²

(1. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China; 2. School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Catalase 2(CAT2) is a key enzyme that controls redox levels and regulates hydrogen peroxide signal transduction in plants. NCA1 is an important molecular chaperone of CAT2 in plants, protecting CAT2 from degradation and helping it function normally. Most of the current prokaryotic expression studies only express CAT2 protein. In order to solve this problem, prokaryotic expression vectors pMAL-p2x-CAT2 and PET28a(+)-NCA1 were constructed using CAT2 and NCA1 genes in *Arabidopsis thaliana*. After transferred into the same *Escherichia coli* competent cell BL21(DE3), co-expression of CAT2 protein in supernatant after cell destruction was successfully obtained. The study of the relevant enzymatic properties showed that the optimal temperature of CAT2 was 20 ℃, and the optimal pH value was 8. The enzyme activity of CAT2 was 580 U/mg, five times that of CAT2 alone, and the protein concentration was 0.42 μg/μL. NO is a signal molecule that can perform nitrosation modification on protein in plants. On the basis of successfully expressing CAT2, NO donor S-nitrosoglutathione(GSNO) was used to treat it. It was found that the enzyme activity of CAT2 was inhibited after NO treatment, and the enzyme activity was recovered after treatment with the reducing agent dithiothreitol(DTT). It is speculated that NO may regulate the enzyme activity of CAT2 through nitrosation modification, thus indirectly affecting the state of intracellular environment.

Key words: catalase; NCA1 gene; prokaryotic expression; carbon monoxide; nitrosation

收稿日期: 2022-06-20; 修回日期: 2022-07-25

基金项目: 安徽省自然科学基金面上资助项目(2208085MC44)

作者简介: 张瑞含(1996—), 男, 黑龙江齐齐哈尔人, 合肥工业大学硕士生;

韩毅(1982—), 男, 安徽马鞍山人, 博士, 安徽农业大学教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: 841424482@qq.com.

过氧化氢广泛存在于动植物体内,是一种稳定的信号分子。拟南芥遭遇生物和非生物胁迫时会产生大量的过氧化氢,改变自身体内的氧化还原状态,并向下游传递信号抵抗胁迫^[1]。拟南芥体内存在着过氧化氢酶家族,可以将过氧化氢分解为水和氧气,能够清除过氧化氢,减少自身细胞受到的损伤,进而维持植物体相对正常的氧化还原状态,调节信号的传递。过氧化氢酶家族有 3 个成员,分别为过氧化氢酶 1(CAT1)、过氧化氢酶 2(CAT2)和过氧化氢酶 3(CAT3),其中 CAT2 在清除过氧化氢过程中发挥着主要作用^[2-3]。有研究发现,当拟南芥遭遇到胁迫时会改变自身的过氧化氢酶活性来应对不同的胁迫^[4-5]。因此研究不同条件下 CAT2 的活性对于理解拟南芥应对胁迫时的 CAT2 活性调节机制是十分必要的。

NO 是植物体内很重要的信号分子,广泛参与到蛋白翻译后修饰过程中^[6]。这种亚硝基化修饰可调节靶蛋白的生理活性、稳定性和蛋白质的构象,从而形成亚硝基化蛋白发挥独特的功能,进而参与植物体各种发育过程和应激反应^[7-8]。

近年来的研究发现,CAT2 蛋白合成后被运输到过氧化物酶体发挥作用需要分子伴侣 NCA1 的协助,当拟南芥中 NCA1 基因发生突变时,CAT 酶活仅为正常植株的 10%~20%,并且还有很大一部分 CAT 被细胞内相关途径分解^[9-10]。目前的研究中,在原核系统表达 CAT2 蛋白,绝大多数 CAT 以包涵体的形式存在于破碎细胞后的沉淀中^[11-12],因此本文通过在一个原核表达系统中共同表达 CAT2 和 NCA1 蛋白,以期望获得正常空间结构的 CAT2 蛋白,并对体外模拟拟南芥体内正常状态的 CAT2 蛋白进行研究。拟南芥 CAT2 蛋白上存在半胱氨酸位点,能否发生谷胱甘肽化或亚硝基化等翻译后修饰尚未知。

本文主要运用原核表达的方法将 CAT2 蛋白在体外表达并顺利分离,分析温度、pH 值以及金属离子对 CAT2 活性的影响;探索 NO 是否会亚硝基化 CAT2 蛋白调节其活性,推测可能存在的间接调节细胞体内的氧化还原状态的机制。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

所用材料有:拟南芥(哥伦比亚野生型)、pMAL-p2x 质粒、PET28a(+)质粒、大肠杆菌 DH5 α 克隆菌株、大肠杆菌 BL21 表达菌株。

所用试剂有:反转录酶、高保真 DNA 聚合

酶、限制性内切酶、Taq 酶、T₄DNA 连接酶、质粒提取试剂盒、MBP 标签凝胶树脂纯化柱、麦芽糖、NaCl、CaCl₂、琼脂粉、胰蛋白胨、酵母提取物、H₂O₂、Tris。

1.2 仪器

所用仪器有:高温高压灭菌锅、微生物培养箱、超净工作台、超声波细胞破碎仪、紫外分光光度计、高速离心机、冰箱等。

1.3 方法

1.3.1 目的基因的克隆

从 TAIR 官网搜索 CAT2 和 NCA1 基因的 cDNA 序列,根据 cDNA 序列分别设计出相应的上、下游引物。

取哥伦比亚野生型拟南芥的新鲜叶片提取总 RNA,将 mRNA 反转录得到 cDNA,将其作为模板对目的基因进行扩增,获得 CAT2 和 NCA1 基因的全编码序列(coding sequence, CDS)。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的程序设定为:98 °C、5 min,98 °C、15 s,58 °C、15 s,72 °C、1 min,72 °C、15 min。将 CAT2 基因与 pMAL-p2x 载体连接,NCA1 基因与 PET28a(+)载体连接后将连接产物分别转入大肠杆菌 DH5 α 内保存,菌落 PCR 确定后,提取质粒并测序。选取测序结果正确的菌株提取质粒转入大肠杆菌 BL21 内,菌落 PCR 鉴定阳性菌落后,保存甘油菌备用。

1.3.2 共表达菌株的制备

首先,选取保存的已转入 CAT2 表达载体的大肠杆菌 BL21 活化摇菌。当菌液 A₆₀₀=0.5 时,取 1 mL 菌液沉淀菌体,用 1 mL 甘油-氯化钙溶液温和吹打细胞重悬菌体,重复 3 次后获得感受态细胞,将测序正确的 NCA1 表达载体转入到制备好的感受态细胞内,涂布于含有 2 种不同抗性的固体 LB 培养基上,挑取单克隆菌落鉴定,鉴定正确后保存甘油菌备用。

1.3.3 蛋白的诱导

将转化好的大肠杆菌 BL21 的甘油菌接种到 4 个装有 250 mL LB、250 μ L Kana、250 μ L Amp 的锥形瓶中,在 37 °C、200 r/min 的条件下培养菌至 A₆₀₀=0.7,随后冷却菌液至室温后,向其中加入 50 μ L IPTG(终浓度为 0.4 mmol/L),在 22 °C 微生物培养箱内诱导 14 h。最后通过 SDS-PAGE 电泳确定诱导是否成功。

1.3.4 蛋白的纯化

高速离心沉淀菌体后用溶液 1(20 mmol/L

Tris-HCl、200 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA, pH 值 7.4)重悬,利用超声波破碎细胞后收集上清液,抽滤后通过 MBP 标签凝胶树脂纯化柱纯化蛋白,收集每步所通过柱子流出的液体。首先将细胞破碎后上清液上样后,用 30 mL 溶液 1 充分洗脱杂蛋白,随后用溶液 2(20 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA、10 mmol/L 麦芽糖, pH 值 7.4)洗脱目的蛋白。利用透析袋将麦芽糖除去后,将蛋白保存在 -80°C 冰箱内备用。

1.3.5 蛋白质量浓度的测定

本文采用分光光度计,利用考马斯亮蓝 G250 进行蛋白质量浓度的测定。首先以牛血清蛋白作为对照,测定标准曲线,随后将目的蛋白稀释到合适倍数后在 595 nm 波长下测定数值,根据标准曲线计算蛋白质量浓度。

1.3.6 过氧化氢酶酶活及其性质的测定

过氧化氢可以被过氧化氢酶分解为 H_2O 和 O_2 ,测定反应体系中吸光度值 A_{240} 变化速率可以计算出过氧化氢酶的酶活。根据测定的蛋白质量浓度确定 CAT2 蛋白的使用量。反应体系由测定 buffer(0.1 mol/L NaH_2PO_4 、1 mmol/L EDTA, pH 值 7.5)、CAT2 蛋白溶液、20 mmol/L H_2O_2 3 个部分组成,反应体系总体积为 1 mL,测定时间为 2 min,根据测得数值计算酶活。

在正常测定体系的基础上,分别在温度为 10、20、30、40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下测定 CAT2 的过氧化氢酶活力。在温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,分别在 pH 值为 5、6、7、8、9、10 的缓冲液中进行测定。将一定量的酶分别在终浓度 1 mmol/L 的金属离子缓冲液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,然后在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下测定 CAT2 的过氧化氢酶活力,把未被处理的 CAT2 酶活记为 100%,计算金属离子处理后剩余的相对酶活力。

1.3.7 NO 和 DTT 处理 CAT2 蛋白

用浓度梯度为 0.25、0.50、0.75、1.00、2.00 mmol/L 的亚硝基谷胱甘肽(GSNO)分别处理 CAT2 蛋白,同时加入等体积缓冲液作为对照组,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min 测定酶活后,加 20 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)后再孵育 30 min,测定 GSNO 处理后被 DTT 恢复的 CAT2 酶活。

2 结果和分析

2.1 CAT2 和 NCA1 的 PCR 扩增结果

本文将哥伦比亚野生型拟南芥的 cDNA 作为模板,分别用 CAT2 和 NCA1 基因的上下游引

物进行扩增,核酸琼脂糖电泳检测结果如图 1 所示。由图 1 可知,所获得的 PCR 产物只有一条特异性条带,与 TAIR 网站上拟南芥 CAT2 和 NCA1 基因大小相符,CAT2 基因大小为 1 479 bp, NCA1 基因大小为 1 218 bp。

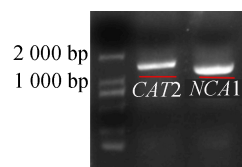


图 1 扩增基因电泳图

2.2 原核表达载体的鉴定

分别提取含有 PET28a(+)-NCA1 和 pMAL-p2x-CAT2 的阳性菌落的质粒进行测序,测序结果显示质粒中目的基因片段是正确的,没有发生任何突变,随后将提取的质粒共同转入同一表达菌株 BL21 中,挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定,确认 CAT2 和 NCA1 基因是否均转入 BL21 中。菌落 PCR 结果电泳图如图 2 所示,图 2 中,同一编号泳道是同一单克隆菌落,在同一单克隆菌落中鉴定到 2 个基因,并且与实际大小相符,因此选择该单克隆作为诱导表达的菌种。

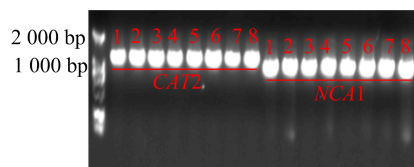


图 2 共转化阳性菌落鉴定结果

2.3 CAT2 蛋白诱导表达及纯化的结果

在 22 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,用 0.4 mmol/L IPTG 诱导蛋白表达 14 h 左右,SDS-PAGE 电泳检测诱导产物如图 3 所示。图 3 中:M 代表蛋白 Marker;泳道 1 代表未加 IPTG 诱导前的大肠杆菌中蛋白质的分布;泳道 2 代表加 IPTG 诱导后的大肠杆菌中蛋白质的分布。由图 3 可知,在接近 100 kDa 处(CAT2 蛋白大小为 56.9 kDa, MBP 标签为 43.2 kDa)和 45 kDa 处(NCA1 蛋白大小为 46.5 kDa, His 标签为 0.6 kDa)与对照泳道 1 相比,泳道 2 均出现了 1 条明显的条带,说明蛋白明显积累,表明 CAT2 蛋白和 NCA1 蛋白在同一大肠杆菌中被成功诱导并进行后续的破碎细胞收集表达的蛋白。诱导后的蛋白利用 MBP 标签凝胶树脂纯化柱进行纯化,蛋白上样后,带有 MBP 标

签的CAT2融合蛋白会特异性结合到柱子上,其他杂蛋白会随着液体在重力的作用下流出,并用缓冲液充分洗脱杂蛋白。麦芽糖会与MBP标签发生竞争性结合,融化蛋白可以被洗脱下来,成功与杂蛋白分离,用SDS-PAGE电泳检测洗脱目的蛋白,结果如图3b所示。由图3b可知,样品洗脱液中含有大量的目的蛋白成功纯化得到CAT2蛋白。利用透析袋将麦芽糖除去后,将目的蛋白分装放置于 -80°C 保存待用。

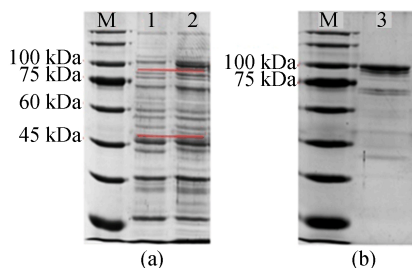


图3 CAT2蛋白诱导表达纯化SDS-PAGE电泳图

2.4 CAT2蛋白的质量浓度及酶活检测结果

以牛血清蛋白为标准蛋白制作标准曲线,据此标准曲线计算蛋白质量浓度为 $0.42\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。在共表达CAT2和NCA1蛋白的同时,单独表达CAT2蛋白作为对照,以过氧化氢作为底物,其酶活如图4所示。图4中:不同字母代表具有显著性差异;相同字母表示没有显著性差异。下同。从图4可以看出,在共表达条件下CAT2酶活约为 $580\ \text{U}/\text{mg}$,而单独表达CAT2蛋白酶活约为 $110\ \text{U}/\text{mg}$ 。CAT2和NCA1共表达帮助CAT2在体外正确的折叠,提高了CAT2的酶活,因此选用共表达蛋白进行后续分析。

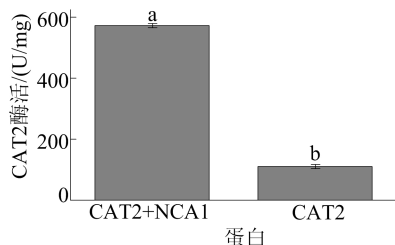


图4 CAT2共表达与单独表达酶活分析

2.5 CAT2蛋白的酶学性质分析

2.5.1 温度对CAT2酶活的影响

在 $10\sim 70^{\circ}\text{C}$ 条件下对CAT2酶活进行检测,结果如图5所示。由图5可知,其最适温度为 20°C ,在 $20\sim 30^{\circ}\text{C}$ 之间保持较高的酶活, 30°C 后

酶活迅速下降,CAT2在室温条件下酶活较好。

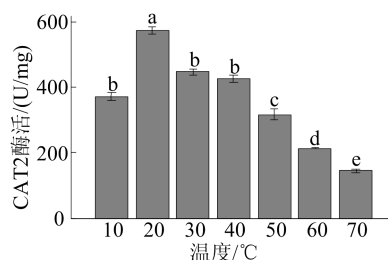


图5 温度对CAT2酶活的影响

2.5.2 pH值对CAT2酶活的影响

在pH值为 $5\sim 10$ 范围内对CAT2的酶活进行检测,结果如图6所示。由图6可知,CAT2蛋白的最适pH值为8,且在碱性条件下还保持一定的酶活力,属于碱性过氧化氢酶。

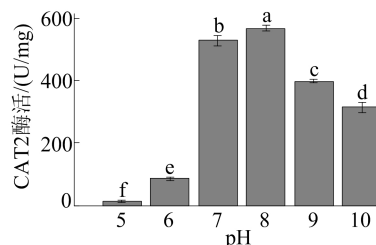


图6 pH值对CAT2酶活的影响

2.5.3 金属离子对CAT2酶活的影响

不同金属离子处理后对CAT2酶活进行检测,结果如图7所示。从图7可以看出: $1\ \text{mmol}/\text{L}$ 的 Na^+ 、 K^+ 对酶活影响不明显; Mg^{2+} 对酶活有一定的促进作用,提高了9%的酶活; Cd^{2+} 对CAT2酶活有较弱的抑制; Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 抑制了CAT2酶5%左右的酶活;而 Cu^{2+} 抑制最明显,直接抑制了80%的酶活。

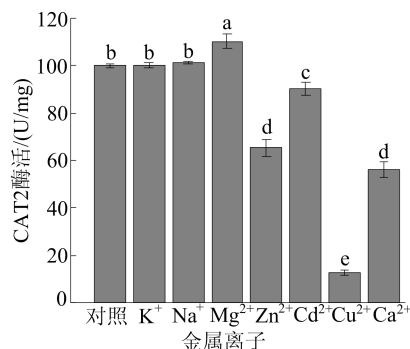


图7 金属离子对CAT2酶活的影响

2.6 NO处理CAT2蛋白后对酶活的影响

用不同浓度NO供体GSNO处理CAT2蛋

白,酶活分析如图 8 所示。由图 8 可知,GSNO 处理蛋白后导致 CAT2 的酶活降低,并且使用还原剂 DTT 再次处理会使 CAT2 酶活恢复到一定程度。说明 NO 可能使 CAT2 蛋白发生亚硝基化修饰,导致 CAT2 酶活力的改变,被还原剂 DTT 处理后还原了这种修饰,酶活得以恢复。

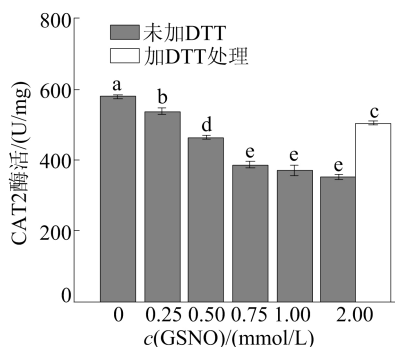


图 8 GSNO 处理 CAT2 后的酶活分析

3 讨 论

过氧化氢是植物体内十分重要的信号分子,通过研究专一性清除过氧化氢的过氧化氢酶的相关性质有利于理解植物体内过氧化氢信号的调节机制。本文成功构建了带有 MBP 标签的 CAT2 蛋白表达载体,增加了 CAT2 蛋白的可溶性,并且在同一个原核表达体系同时表达 NCA1 蛋白,帮助 CAT2 蛋白形成正确的空间结构,从而在体外可控的条件下对 CAT2 蛋白进行研究,解决了植物源 CAT2 蛋白在原核表达系统不容易产生可溶性表达的难题。

成功诱导蛋白表达并纯化后,发现共表达的 CAT2 蛋白酶活是单独表达 CAT2 蛋白的 4~5 倍,推测 NCA1 可能在蛋白合成的过程中发挥了一定作用。随后通过对 CAT2 蛋白进行酶学性质分析,发现其最适合温度为 20 °C,最适 pH 值为 8,其在 Na⁺、K⁺、Mg²⁺ 等金属离子的存在下可以相对稳定地发挥作用。在使用 NO 处理 CAT2 蛋白后,发现其酶活发生改变,推测 CAT2 蛋白上的某些半胱氨酸位点被 NO 修饰从而影响了 CAT2 的酶活。NO 对于 CAT2 蛋白的修饰可能是植物体内不同信号分子之间的相互调控机制,从而改变植物体内的状态来应对外来胁迫,维持细胞的相对稳定。

[参 考 文 献]

- [1] WASZCZAK C, CARMODY M, KANGASJÄRVI J. Reactive oxygen species in plant signaling[J]. Annual Review of Plant Biology, 2018, 69: 209-236.
- [2] MHAMDI A, QUEVAL G, CHAOUCH S, et al. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models[J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(15): 4197-4220.
- [3] LAM N B, GHOSH A. Comprehensive analysis and transcript profiling of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* catalase gene family suggests their specific roles in development and stress responses[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 123: 54-64.
- [4] ONG B, WANG X, XU P, et al. Isolation and abiotic stress resistance analyses of a catalase gene from *Ipomoea batatas* (L.) Lam [J]. BioMed Research International, 2017, 2017: 6847532.
- [5] SU Y, GUO J, LING H, et al. Isolation of a novel peroxisomal catalase gene from *sugarcane*, which is responsive to biotic and abiotic stresses[J]. PLoS ONE, 2014, 9(1): e84426.
- [6] CHEN L, WU R, FENG J, et al. Transnitrosylation mediated by the non-canonical catalase ROG1 regulates nitric oxide signaling in plants[J]. Developmental Cell, 2020, 53(4): 444-457.
- [7] ZHANG T R, MA M Y, CHEN T, et al. Glutathione-dependent denitrosation of GSNOR1 promotes oxidative signalling downstream of H₂O₂ [J]. Plant, Cell & Environment, 2020, 43(5): 1175-1191.
- [8] ZHOU X, JOSHI S, KHARE T, et al. Nitric oxide, crosstalk with stress regulators and plant abiotic stress tolerance[J]. Plant Cell Reports, 2021, 40(8): 1395-1414.
- [9] HACKENBERG T, JUUL T, AUZINA A, et al. Catalase and NO CATALASE ACTIVITY1 promote autophagy-dependent cell death in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2013, 25(11): 4616-4626.
- [10] LI J, LIU J T, WANG G Q, et al. A chaperone function of NO CATALASE ACTIVITY1 is required to maintain catalase activity and for multiple stress responses in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2015, 27(3): 908-925.
- [11] 张亚萍. 小麦过氧化氢酶的表达与性质及其对面粉加工品质的影响[D]. 广州: 华南理工大学, 2019
- [12] 刘裕峰, 朱天辉, 刘应高, 等. 板栗过氧化氢酶基因 *CmCAT* 的克隆与原核表达[J]. 四川农业大学学报, 2019, 37(2): 168-176.

(责任编辑 闫杏丽)