

基因编码 3-氯酪氨酸改造荧光蛋白*

张 维¹⁾ 王玥琦²⁾ 王江云^{1)**}

(¹⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; (²⁾北京大学生命科学学院, 北京 100871)

摘要 蛋白质翻译后修饰产生的 3-氯酪氨酸 (3-Cl-Tyr) 与多种疾病相关, 包括帕金森病、哮喘、动脉粥样硬化等。在动脉粥样硬化患者中发现 ApoA1 192 位酪氨酸有高水平的氯化, 显示此种修饰可能会促进病变。为了研究酪氨酸氯代对蛋白质功能的调控作用, 我们发展了将 3-Cl-Tyr 定点特异插入到蛋白质中的方法。因为 3-Cl-Tyr 酚羟基上的质子比酪氨酸 (Tyr) 更容易解离, 具有更低的 pK_a , 在绿色荧光蛋白 GFP 及其突变体, 以及光转化荧光蛋白 mEOS2 荧光活性中心中分别用 3-Cl-Tyr 取代 Tyr, 使得 GFP 发色基团的 pK_a 降低到 4.7, 并且具有与 EGFP 相似的量子产率, 使 mEOS2 发色基团的 pK_a 降低到 4.2。这样使得荧光蛋白的发色基团在酸性条件下仍然能以去质子化形式存在, 在 500 nm 以上仍然具有较强吸收, 避免了用 400 nm 左右激光激发及其对细胞及细胞器造成的光损伤。这种新型的荧光蛋白突变体将适用于溶酶体、吞噬酶体等酸性细胞器。

关键词 绿色荧光蛋白, 非天然氨基酸, 密码子扩展

学科分类号 Q6

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00299

生物体产生的活性氧物质一方面可以起到防御和免疫作用, 另一方面会对自身蛋白造成氧化损伤, 其中酪氨酸氯代是一种常见的氧化修饰, 目前已知这种氧化修饰与帕金森氏病、哮喘、动脉粥样硬化、急性心肌梗死等疾病密切相关^[1-2]。

载脂蛋白 ApoA1 是高密度脂蛋白主要成分, 介导胆固醇从血管壁到血液的反向运输。ApoA1 192 位酪氨酸是髓过氧化物酶氯代修饰的主要位点, 在动脉粥样硬化患者中发现有高水平的 ApoA1 氯代^[3]。目前研究 ApoA1 氯代与功能主要采用位点突变和次氯酸氯化的方法, 除了 192 位酪氨酸可以被氯化, 其他氨基酸和位点也可以被氯化或氧化, 从而使目前 ApoA1 氯化氧化与功能损伤的关系仍然存在争议^[4-5]。

我们发展了基因密码子扩展的方法, 进化出特异性识别 3-Cl-Tyr 的氨酰 tRNA 合成酶/tRNA 正交对, 为体内和体外研究蛋白质中酪氨酸氯代修饰对其功能的调节作用提供了有力的方法。另外, 3-Cl-Tyr 比 Tyr 的酚羟基更容易解离去质子化, 具有更低的 pK_a 值。在绿色荧光蛋白 GFP 包含有 Ser-Tyr-Gly 交联形成的荧光活性中心^[6](图 1), 我

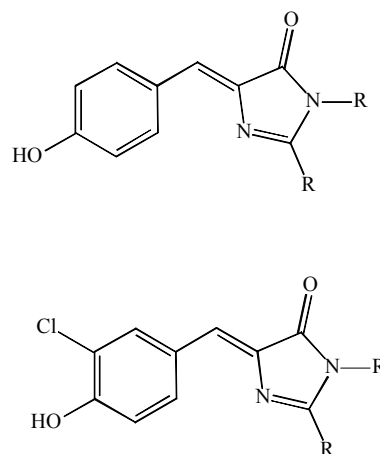


Fig. 1 Chromophore structure of GFP(top) and GFP66-Cl-Tyr(bottom)

* 国家自然科学基金(30870592, 90913022)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64852570, E-mail: jwang@ibp.ac.cn

收稿日期: 2011-07-02, 接受日期: 2011-10-18

们设想在 GFP 荧光活性中心用 3-Cl-Tyr 取代 Tyr 会降低荧光活性中心 pK_a , 使其在酸性条件下, 荧光活性中心主要以去质子化形式存在. 在质子化状态, GFP 发色基团吸收峰波长为 397 nm, 在紫外区域. 这个波段的光会给细胞带来光损伤, 且较容易造成荧光蛋白的漂白. 在去质子化状态, GFP 发色基团激发波长在 488 nm 左右, 给细胞带来光损伤较小. 因此, 在活细胞中标记和追踪蛋白质, 需要 GFP 发色基团具有较低的 pK_a , 吸收最大峰在可见光范围.

生物体内有一些酸性的环境, 如溶酶体 (lysosome)、与溶酶体相关的自噬体 (autophagosome) 及抗原呈递过程中的吞噬酶体 (phagolysosome), 其内部 pH 在 4~5 之间. 当 EGFP 进入酸性细胞器内部, 会引起 488 nm 吸收减弱^[7]. 目前有引入红色荧光蛋白 mRFP 来标记自噬体^[8]. 由于 mRFP 发色基团 pK_a 为 4.5, 在自噬体中不影响其荧光亮度.

虽然有红色荧光蛋白 dsRed pK_a 4.3^[9]、青色荧光蛋白 ECFP pK_a 4.7^[10], 但是目前使用的绿色荧光蛋白 EGFP pK_a 6.0, 黄色荧光蛋白 pK_a 5.6 均不适合在溶酶体等酸性细胞器中进行蛋白质标记. 而多种蛋白质的动态相互作用, 往往需要多种不同颜色的荧光蛋白来标记. 因而, 开发低 pK_a 的绿色荧光蛋白, 黄色荧光蛋白及光转化荧光蛋白可以完善在酸性细胞器内的荧光标记方法^[11].

1 材料和方法

1.1 试剂

3-Cl-Tyr 购自吉尔生化公司; 引物来自上海生工公司; DH10B 菌株、pet24a-GFP 基因载体由本实验室保存; mEOS2 基因由中国科学院生物物理研究所徐涛研究员惠赠.

1.2 质粒构建

GFP 系列突变体均用 Pet24a-GFP 载体进行 PCR 获得. 利用 PCR 方法, 将 mEOS2 基因扩增末端带有 *Nde* I、*Xho* I 酶切位点, 酶切连接到 pet24a 载体上. 将筛选出来的 3-Cl-TyrRS 构建到 pEVOL 载体上, pEVOL 含有两个氨酰 tRNA 合成酶, 一个由阿拉伯糖操纵子控制, 酶切位点为 *Bgl* II 和 *Sal* I, 一个是 *Gln* 启动子和终止子控制, 酶切位点为 *Nde* I 和 *Pst* I. 首先用末端带有 *Bgl* II 和 *Sal* I 酶切位点的引物扩增 3-Cl-TyrRS, 使用 pfu-Taq 酶, PCR 条件: 预变性 94°C 4 min; 变性 94°C 45 s, 退火 48°C 到 60°C 梯度 1 min, 延伸 72°C

1.5 min, 30 个循环; 最后延伸 30 min. 酶切 PCR 产物: 20 μ l 体系 0.5 μ g, *Bgl* II 和 *Sal* I 各 1 μ l, 缓冲液 H 2 μ l 37°C 4 h. pEVOL 质粒酶切条件同 PCR 产物, 1 μ g. 连接: 20 μ l 体系, 50 ng 酶切质粒, 50 ng 酶切 PCR 产物, 2 μ l 缓冲液, 1 μ l T4 连接酶, 16°C 连接过夜. *Pst* I、*Nde* I 酶切位点酶切连接方式相同, 所使用酶为 *Pst* I 和 *Nde* I.

Pet24a-EGFP 的构建是通过 overlap PCR 方法, 在 GFP 基因上引入 F64L、S65T. pet24a-YFP 的构建是通过 overlap PCR 方法, 引入 S65G、S72A、K79R、T203Y. 同样方法, 在 GFP、EGFP、YFP66 位引入 TAG 突变, 在 GFP、YFP203 位引入 TAG, mEOS2 63 位引入 TAG 突变.

以上突变位点引入是在包含有目标基因的 pet24a 载体上引入, 由正反向引物扩增整个质粒, 使用 TaKaRa La-Taq 酶, PCR 条件: 预变性 94°C 4 min; 变性 94°C 45 s, 退火 48°C 到 60°C 梯度 1 min, 延伸 72°C 10 min, 30 个循环; 最后延伸 30 min. PCR 产物取 9 μ l, 加 1 μ l *Dpn* I 37°C 酶切 4~6 h, 降解模板甲基化质粒, 转化感受态细胞.

以上基因克隆及构建突变体所用引物如表 1 所示.

1.3 筛选 3-Cl-Tyr 特异性氨酰 tRNA 合成酶

为了位点特异性地插入 3-Cl-Tyr, 需要在 *E. coli* 引入的氨酰 tRNA 合成酶 /tRNA 正交对^[12], 这个正交对来源于 *Methanococcus jannaschii* 琥珀抑制酪氨酸 tRNA (MjtRNA^{Tyr}_{CUA}) / 酪氨酸 tRNA 合成酶 (MjTyrRS) 对. MjTyrRS 突变库构建在卡那霉素抗性质粒在 *E. coli* 谷氨酰胺合成酶的启动子和终止子之间. 所使用合成酶突变库 pBk-lib-jw1^[13].

通过正负筛选来进化特异性识别 3-Cl-Tyr 的氨酰 tRNA 合成酶. 正筛选质粒 pRep-2YC 包含有 MjtRNA^{Tyr}_{CUA}、TAG 突变的氯霉素乙酰转移酶基因、启动表达绿色荧光蛋白的琥珀突变的 T7 RNA 聚合酶、四环素抗性基因. 负筛选质粒包含有 MjtRNA^{Tyr}_{CUA}、在阿拉伯糖操纵子下的琥珀突变芽孢杆菌 RNA 酶基因以及氨苄青霉素抗性基因.

包含有正筛选质粒 pRep-2YC 及合成酶突变库 pBk-lib-jw1 的 *E. coli* DH10B 细胞作为正筛选寄主细胞. 涂布在含有 1 mmol/L 3-Cl-Tyr、50 mg/L 卡那霉素、60 mg/L 氯霉素、15 mg/L 四环素的 LB 琼脂糖培养基盘上, 并于 37°C 培养 60 h. 收取细胞,

Table 1 Primers used for cloning and mutation

Primer type	Forward	Backward
External	START	END
3-Cl-TyrRS <i>Bgl</i> II, <i>Sal</i> I	5' GGAAGATCTATGGACGAATTTGAAATGATAAAAG 3'	5' ACGCGTCGACTTATAATCTCTTTCTATTGGCTC 3'
ApoA1 <i>Nde</i> I, <i>Xho</i> I	5' GGGAATTCATATGCCGAGCAGAGTCCATGGGATCGCGTGAAGGAC 3'	5' CGCTATCTCGAGCGGCGGGTATCCTGGTGTTAAGTCTTCTAGTACTCTTC 3'
mEOS2 <i>Nde</i> I, <i>Xho</i> I	5' GGGAATTCATATGATGAGTGCATTAAGCCAGACATG 3'	5' CGCTATCTCGAGTCGTCTGGCATTGTCAGGCAAT 3'
Internal		
F64L, S65T	5' CACTACTCTGACCTATGGTGTCAATGCTTTCC 3'	5' ACCATAGGTCAGAGTAGTGACAAGTTGGCCATG 3'
S65G-S72A-K79R	5' TGCTTTGCGCGTTATCCGGATCACATGCTGCGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATG 3'	5' ATAACGCGCAAAGCATTGAACACCATAGCCGAAAGTAGTGACAAGTGTGGCCATG 3'
T203Y	5' CTGTCGTATCAATCTGCCCTTTCGAAAGATC 3'	5' AGATTGATACGACAGGTAATGGTTGCTGGTA 3'
GFP-Y66TAG	5' TTCTCTAGGGTGTTCATGCTTTGCGCGTTATC 3'	5' TGAACACCCTAAGAGAAAGTAGTGACAAGTGTG 3'
EGFP-Y66TAG	5' CTGACCTAGGGTGTTCATGCTTTGCGCGTTATC 3'	5' TGAACACCCTAAGGCAGAGTAGTGACAAGTGTG 3'
YFP-Y66TAG	5' TTCGGCTAGGGTGTTCATGCTTTGCGCGTTATC 3'	5' TGAACACCCTAGCCGAAAGTAGTGACAAGTGTG 3'
Y203TAG	5' CTGTCGTAGCAATCTGCCCTTTCGAAAGATC 3'	5' AGATTGCTACGACAGGTAATGGTTGCTGGTA 3'
ApoA1-Y192TAG	5' GCCGAGTAGCACGCCAAGGCCACCGAGCATCTG 3'	5' GGCGTGCTACTCGCCAGTCTGGCGCCGCCG 3'
mEOS2-Y63TAG	TCCATTAGGGCAACAGGTATTCCGCAAAAT	GTTGCCCTAATGGAATGCAGTGGTCAGGATA

提取质粒 DNA, 电泳分离, 胶回收. 经过正筛选的 pBK-lib-jw1 转化到包含负筛选质粒 pNeg 的 DH10B 感受态细胞中, SOC 培养基中恢复 1 h. 之后涂在包含 0.2% 阿拉伯糖的 LB 固体培养基, 37°C 培养 8~12 h. 如此进行 3 轮正负筛选. 最后一轮挑选 384 个克隆, 挑选在 1 mmol/L 3-Cl-Tyr、120 mg/L 氯霉素培养基生长, 而在没有 3-Cl-Tyr、40 mg/L 氯霉素培养基中不生长的克隆. 生长差异最明显的克隆命名为 3-Cl-TyrRS.

1.4 表达肌红蛋白 (myoglobin) TAG4 3-Cl-Tyr 突变体, 质谱鉴定分子质量

将 pBad-myoglobin(4TAG) 质粒和 pBk-3-Cl-TyrRS 质粒共转到 DH10B 细胞中, 于 37°C 培养到 A_{600} 为 0.5 时, 在培养基中加入 1 mmol/L 3-Cl-Tyr, 0.2% 阿拉伯糖, 对照不加入 3-Cl-Tyr. 12 h 之后, 取 100 ml 菌液离心加入 20 ml lysis 缓冲液重悬细胞. Lysis 缓冲液: pH 8.0, 0.06 mol/L NaH_2PO_4 , 0.3 mol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑. 超声破碎: 冰浴, 200W, 超声 6 s, 停 6 s, 总时间 20 min, 离心后

取上清和 1 ml Ni-NTA 填料于冰上震荡结合 1 h. 在自重柱上先用 4 ml Lysis 缓冲液洗 1 次, 然后用 4 ml 洗涤缓冲液洗 2 次, 洗涤缓冲液其他盐分浓度与裂解缓冲液相同, 咪唑浓度为: 20 mmol/L. 之后用 2 ml 含 250 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱. 3 KD Millipore 超滤管超滤除盐. 2 g/L 蛋白质溶解在 2.5 mmol/L Tris 缓冲液中, ESI-TOF 质谱检测分子质量, 质谱仪型号 CapLC-Q-ToF micro.

1.5 表达插入 3-Cl-Tyr 的荧光蛋白

共转 pEVOL-3-Cl-TyrRS 及相应的荧光蛋白载体到 BI21(DE3) 细胞. 细胞生长到 A_{600} 为 0.8 时, 加入 1 mmol/L 3-Cl-Tyr、0.5 mmol/L IPTG、0.2% 阿拉伯糖, 37°C 培养 12 h. 收集细胞, Ni-NTA 柱纯化蛋白, 超滤脱盐, 纯化条件同肌红蛋白 (myoglobin) 纯化. Electrospray LC-MS 质谱鉴定分子质量, 质谱仪型号: Agilent Technologies 6110 mass spectrometry. 荧光蛋白表达载体如下, 括号内为相应突变位点: pet24a-GFP(66TAG), pet24a-GFP(203TAG), pet24a-EGFP(66TAG), pet24a-

YFP (66TAG), pet24a-YFP (203TAG), pe24a-mEOS2 (63TAG).

1.6 荧光蛋白发色基团 pK_a 测定

20 $\mu\text{mol/L}$ 荧光蛋白置于 pH 3.0~10.8 缓冲溶液中, 测定去质子化状态吸收峰. 设定 pH 10.8 时去质子化比例为 1. 其他 pH 值时, 去质子化状态最高吸收峰波长的光吸收与 pH 10.8 时光吸收的比例为相应去质子化比例. 测定值做图, pH 值为 x 轴, 去质子化比例为 y 轴, 根据 Henderson-Hasselbalch 公式:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \lg \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = \text{p}K_a - \lg \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} \quad (1)$$

$$\lg \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} = \text{p}K_a - \text{pH} \quad (2)$$

$$\frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} = 10^{\text{p}K_a - \text{pH}} \quad (3)$$

$$y = \frac{[\text{A}^-]}{[\text{A}^-] + [\text{HA}]} = \frac{1}{\frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} + 1} \\ = \frac{1}{10^{\text{p}K_a - \text{pH}} + 1} = \frac{1}{10^{\text{p}K_a - x} + 1} \quad (4)$$

测定的 pH 值(x), 去质子化比例(y)根据公式 4 拟合曲线, 计算 pK_a .

测定荧光蛋白 pK_a 时所使用不同 pH 值的缓冲液: 0.1 mol/L 柠檬酸-0.2 mol/L Na_2HPO_4 缓冲液, pH 3.0~7.0; 50 mmol/L Tris 缓冲液, pH 7.5~10.0; 0.1 mol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液, pH 10.5, 10.8. SHIMADZU UV-1800 紫外分光光度计测吸光度, 扫描范围 240 nm~700 nm.

1.7 荧光蛋白光学性质检测

Hitachi F4500 荧光分光光度计检测. 发射波谱测定: EFP66-Cl-Tyr (66 位被 3-Cl-Tyr 取代)、EFP、GFP66-Cl-Tyr 激发波长设定为 450 nm, 扫描 450 nm~700 nm 发射谱. GFP203Y、GFP203-Cl-Tyr、GFP 激发波长设定为 375 nm, 扫描 380 nm~700 nm 发射波谱. YFP、YFP203-Cl-Tyr、YFP66-Cl-Tyr 激发波长设定为 470 nm, 扫描 470 nm~700 nm 发射波谱. 激发波谱测定: EGFP66-Cl-Tyr、EGFP、GFP66-Cl-Tyr 发射波长设定为 545 nm, 扫

描 200 nm~540 nm 光激发波谱. GFP203Y、YFP66-Cl-Tyr、GFP 发射波长设定为 565 nm, 扫描 200 nm~560 nm 光激发波谱. YFP、YFP203-Cl-Tyr 发射波长设定为 560 nm, 扫描 200 nm~555 nm 光激发波谱. mEOS2 发射光谱和激发光谱使用 Thermo Scientific Varioskan Flash 光谱扫描多功能读数仪测量.

1.8 荧光量子产率

GFP66-Cl-Tyr、EGFP、EGFP66-Cl-Tyr、GFP 溶于 pH 7.0 50 mmol/L Tris 缓冲液, 488 nm 光吸收为 0.1, 514 nm 光激发, 扫描 495 nm~700 nm 发射波谱. 积分 495 nm~620 nm 发射波谱, 以已发表的 EGFP 荧光量子产率 0.60 为标准. YFP、YFP66-Cl-Tyr、YFP203-Cl-Tyr、GFP203-Cl-Tyr、GFP203Y 溶于 pH 7.0 50 mmol/L Tris 缓冲液中, 稀释至 514 nm 光吸收为 0.1, 514 nm 光激发, 扫描 520 nm~700 nm 光发射波谱. 积分 520 nm~620 nm 发射波谱, 以已发表的 YFP 量子产率 0.60 为标准^[14].

2 结 果

2.1 筛选 3-Cl-Tyr 的氨酰 tRNA 合成酶

因为 3-Cl-Tyr 是 Tyr 的衍生物, 所以我们选择了 Mj-酪氨酸氨酰 tRNA 合成酶 /MjtRNA_{CUA}^{Tyr} 正交对筛选. 选择合成酶突变库 pBk-lib-jw1^[13]. 筛选出 3 个克隆, 在含有 1 mmol/L 3-Cl-Tyr, 120 mg/L 氯霉素的 LB 固体培养基上, 于 37°C 培养 24 h 有明显菌斑. 不加 3-Cl-Tyr, 40 mg/L 氯霉素培养基上 37°C, 培养 24 h, 几乎不生长. 测序结果如表 2. 其中克隆 1 非天然氨基酸插入效率最高, 命名为 3-Cl-TyrRS, 突变位点为 H70A、D158S、I159S (图 2). 3-Cl-Tyr 取代 Tyr 需要更大的空间, 而 H70A 及 D158S 突变都是由大侧链氨基酸突变为小侧链氨基酸, 可以提供足够的空间来容纳 Cl 原子. 更加详细的 3-Cl-TyrRS 与 3-Cl-Tyr 识别的机制将有赖于晶体结构的解析, 有关工作正在进行中.

Table 2 Clones of aminoacyl-tRNA synthetase for 3-Cl-Tyr and mutation sites

Clones	Y32	I63	L65	H70	F108	Q109	Y114	D158	I159	L162	V164
1				A				S	S		
2	E		T	T	S	G	S	Q			
3	E	G	I	T		V		T		T	G

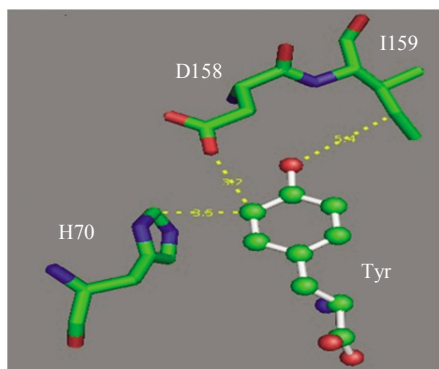


Fig. 2 Active site structure of MjTyrRS with Tyr bound

2.2 3-Cl-Tyr 插入效率的验证

含有 C 端 6 个组氨酸(6His)标签的抹香鲸肌红蛋白(myoglobin)4 位 Ser 突变为琥珀密码子, 在存在 MjtRNA^{Tyr}_{CUA}、3-Cl-TyrRS、1 mmol/L 3-Cl-Tyr 的情况下在 LB 培养基中表达. 对照组不加

3-Cl-Tyr. 6His 标签的 myoglobin 用 Ni-NTA 柱纯化. SDS-PAGE 分析(图 3)表明, 只有存在 3-Cl-Tyr 的情况下才能纯化出全长的 myoglobin, 说明 3-Cl-TyrRS 可以特异性地识别 3-Cl-Tyr. LB 培养基中 3-Cl-Tyr myoglobin 产率为 2~5 mg/L. 为了检测 3-Cl-Tyr 是否高效特异插入到 myoglobin 第 4 位琥珀突变位点, 我们对 3-Cl-Tyr myoglobin 进行了 ESI-TOF 质谱检测, 其分子质量为 18 465 u (图 4), 与计算分子质量 18 465.5 u 吻合.

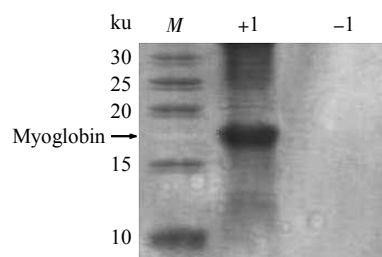


Fig. 3 Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel showing expression of the myoglobin TAG4 mutant in the presence(+1) and absence(-1) of 1 mmol/L 3-Cl-Tyr

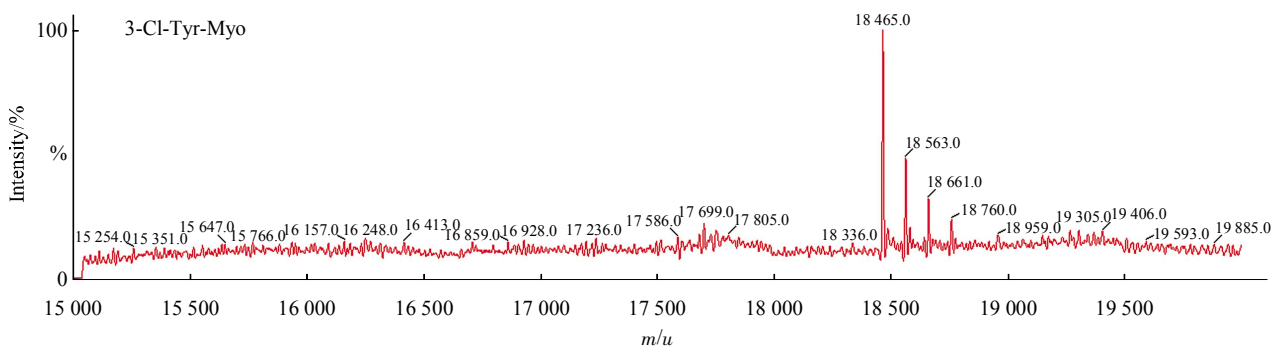


Fig. 4 ESI-TOF mass spectra of myoglobin TAG4 3-Cl-Tyr mutant

Theoretical mass: 18 465.5 u, experimental value: 18 465 u.

2.3 GFP 系列荧光蛋白 66 或 203 位点 3-Cl-Tyr 突变体光学性质

我们进一步将 3-Cl-Tyr 插入到绿色荧光蛋白的系列突变体: GFP(66TAG)、EGFP(66TAG)、YFP(66TAG)、GFP203(TAG)、YFP(203TAG). 进一步测定了插入非天然氨基酸, 以及野生型绿色荧光蛋白的吸收光谱和摩尔消光系数(表 3, 图 5).

在 pH 7.0 情况下, 从最大光吸收峰来看, 66 位 Tyr 替代为 3-Cl-Tyr 后引起光吸收向红光方向偏

移约 5~10 nm. 值得注意的是, GFP 最大光吸收为 396 nm, 是质子化荧光活性中心的光吸收, 而 GFP66-Cl-Tyr 最大光吸收是 488 nm, 对应于去质子化状态荧光活性中心光吸收.

从摩尔消光系数来看, 荧光活性中心氯代对比野生型荧光蛋白摩尔消光系数均有增加. 其中 EGFP66-Cl-Tyr 消光系数增加 41%. 而在 203 位 3-Cl-Tyr 取代 Tyr 没有显著影响绿色荧光蛋白光吸收和摩尔消光系数.

Table 3 Absorbance and fluorescent property of GFP and YFP and 3-Cl-Tyr mutants

Mutation	λ_{ex}	λ_{em}	$QY(\text{quantum yield})$	$\epsilon M(\lambda_{max})$	pK_a
GFP	397	507	0.79 ± 0.01	22 305	>10.8
EGFP	491	508	0.60 ± 0.01	36 708	6.0
GFP66 3-Cl-Tyr	492	509	0.57 ± 0.02	29 515	4.7
EGFP66 3-Cl-Tyr	500	514	0.49 ± 0.01	51 882	4.7
GFP203-Tyr	510	518	0.34 ± 0.01	22 309	>10.8
			0.23 ± 0.01		
GFP203-Cl-Tyr	510	524	0.37 ± 0.02	21 717	>10.8
			0.39 ± 0.01		
YFP	515	527	0.60 ± 0.05	65 226	5.6
YFP66Cl-Tyr	520	534	0.37 ± 0.07	68 814	4.9
YFP203-Cl-Tyr	516	524	0.35 ± 0.02	63 954	5.6

λ_{ex} is the wavelength (nm) of absorption maxima. λ_{em} is the wavelength (nm) of emission maxima. $\epsilon M(\lambda_{max})$ is the absorbance extinction coefficient ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) at absorption maxima.

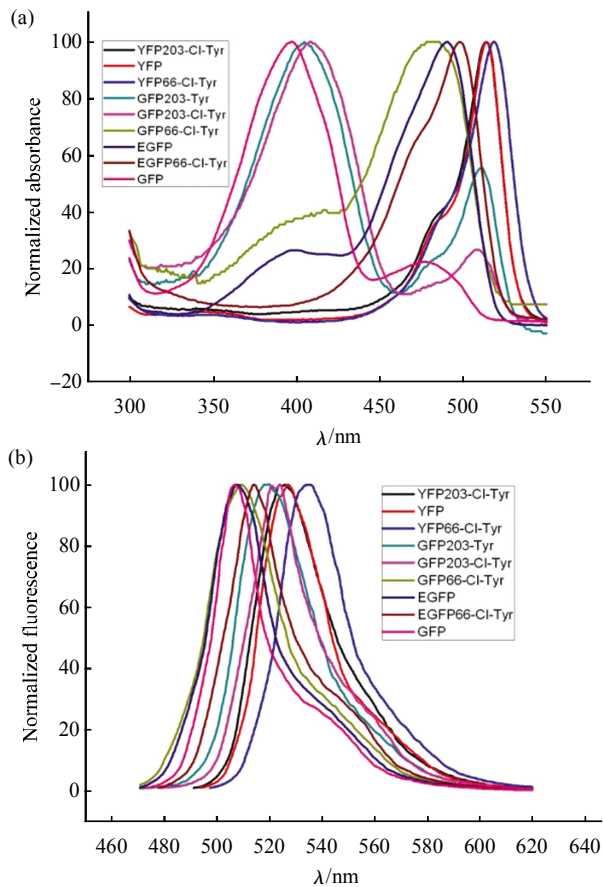


Fig. 5 Absorption (a) and fluorescence (b) spectra of GFP mutants

我们进一步在 pH 7.0 情况下, 测定了绿色荧光蛋白不同突变体的荧光性质(表 3, 图 5). 突变体比野生型蛋白荧光量子产率有所降低. 但是 GFP203-Cl-Tyr 突变体比 GFP203-Tyr 在 405 nm 左右光激发荧光量子产率有所提高, 由 0.23 增高到 0.39.

通过测定不同绿色荧光蛋白突变体在不同 pH 下光吸收情况, pH 从 3.0 到 10.8, 我们测定了不同绿色荧光蛋白突变体的 pK_a (表 3, 图 6). 其中 GFP、GFP203-Cl-Tyr、GFP203-Cl-Tyr 在 pH 3.0 到 10.8 范围内光吸收没有明显的变化, 故其 pK_a 高于我们测定的 pH 范围, 在 pH 10.8 以上. 其他绿色荧光蛋白突变体的 pK_a 如图 6 和表 3 所示.

发色中心氯代能够明显降低绿色荧光蛋白的 pK_a , 其中 EGFP66-Cl-Tyr 和 YFP66-Cl-Tyr 的 pK_a 均比野生型降低 1 左右. 而 GFP66-Cl-Tyr 降低 pK_a 最明显, 由原来的 pH 10.8 以上, 降低到 pH 4.7.

2.4 mEOS2 荧光蛋白 63 位 3-Cl-Tyr 突变体光学性质

我们将 mEOS2 Tyr63 替换为 3-Cl-Tyr, 对于 mEOS2 的绿色荧光状态, 其吸收光谱最大吸收峰为 506 nm, 发射光谱峰值为 519 nm. 对于 mEOS2-63-Cl-Tyr 的绿色荧光状态, 测得吸收峰为 502 nm, 发射峰为 518 nm. 可见吸收峰向短波长

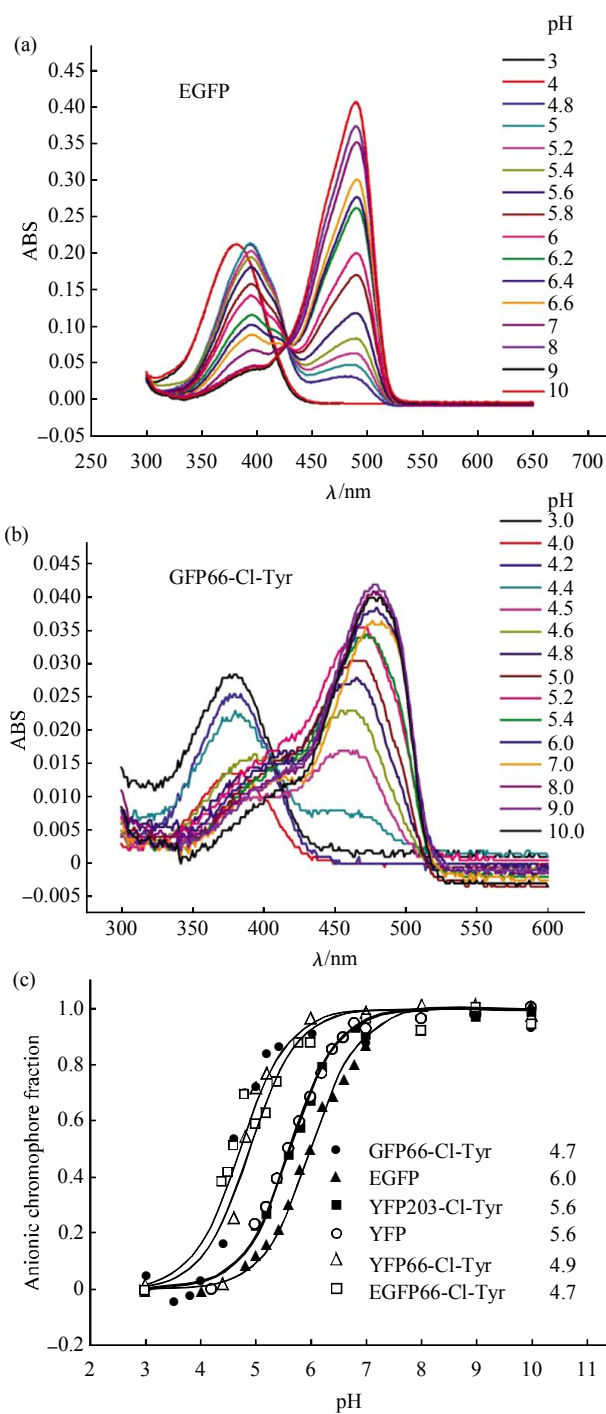


Fig. 6 GFP mutants pH titration

EGFP and GFP66-Cl-Tyr absorption spectra in buffers ranging from pH 3.0 to pH 10.0(a, b). GFP mutants anionic chromophore fraction (c).

移动 4 nm, 而发射峰几乎没变(图 7). 对于绿色荧光状态的 mEOS2-63-Cl-Tyr, 随着 pH 的降低,

502 nm 吸收峰逐渐降低, 在 381 nm 出现吸收峰并逐渐升高(图 8). 在 pH 3.0 时, 502 nm 吸收峰几乎完全消失. 与野生型类似, 3-Cl-Tyr-mEOS2 的 381 nm 吸收峰对应着发色团质子化状态的光吸收, 而 502 nm 吸收峰对应着去质子化发色团的光吸收. 发色团的质子化与去质子化发生在酪氨酸的酚羟基上. 3-Cl-Tyr 使得质子化状态的吸收峰向短波方向移动了 14 nm. 吸收光谱随 pH 变化的过程中, 在 426 nm 处存在一个等消光点, 其吸光值不随 pH 的变化而变化. 3-Cl-Tyr mEOS2 在 502 nm 的吸收峰随 pH 的变化可以用 Henderson-Hasselbalch 方程拟合, 得到 $pK_a=4.2$. 与之相比较, 野生型 mEOS2 的 pK_a 为 5.6.

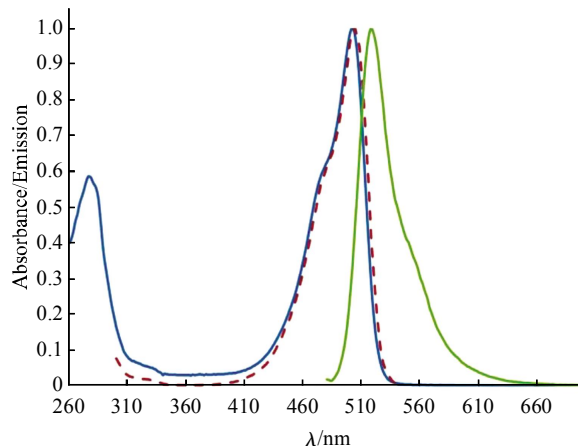


Fig. 7 Absorption, excitation and fluorescence spectra of mEOS2-63 3-Cl-Tyr

—: Absorbance; - - -: Fluorescence emission (556em); —: Fluorescence excitation (465ex).

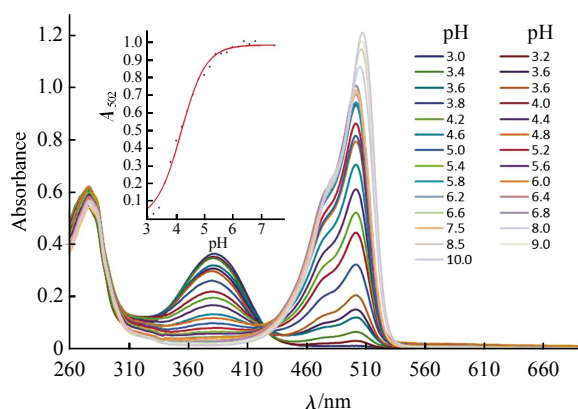


Fig. 8 mEOS2-6 3-Cl-Tyr pH titration

3 讨 论

通常研究蛋白酪氨酸氯化损伤影响蛋白质功能, 在体外研究主要采用次氯酸等氧化剂进行体外氯化, 这种方法的缺点是没有特异性, 很多酪氨酸位点都可以氯化, 同时又会引起假阳性, 因为其他氨基酸被氧化同样会引起功能损伤, 且这种方法不能应用于活体或活细胞研究. 我们通过基因密码扩展方法, 在目标蛋白任意位点引入 TAG 琥珀密码子, 可以特异地将 3-Cl-Tyr 定点特异插入到目标蛋白, 从而可以研究特定位点酪氨酸氯化引起的蛋白质结构功能的变化.

多数荧光蛋白荧光活性中心包含有酪氨酸交联形成的共轭体系, 具有质子化和去质子化两种状态. 由于氯原子的电负性较大, Cl-Tyr 的 pK_a 为 8.3, 低于 Tyr 的 pK_a (10.5)^[15], 因此在荧光活性中心用 3-Cl-Tyr 取代 Tyr 会降低发色基团的 pK_a . EGFP66-Cl-Tyr, 以及 YFP66-Cl-Tyr 突变的 pK_a 均比 EGFP 或 YFP 降低 1 左右. 从荧光量子产率来看, 荧光活性中心氯代的突变体比野生型量子产率有所降低. 但是 GFP66-Cl-Tyr 荧光量子产率为 0.57, 与 EGFP 荧光量子产率 0.60 相当.

mEOS2 由于在 400 nm 强光照条件下, 会由发绿色荧光转化为发红色荧光, 是研究超高分辨率荧光成像的理想标记物. 其荧光活性中心由 His62-Tyr63-Gly64 共轭交联形成^[11, 16]. 绿色状态的 mEOS2 pK_a 为 5.6, 我们通过用 3-Cl-Tyr 取代 Tyr 使其 pK_a 降低到 4.2, 使其可以在溶酶体和吞噬酶体中保持去质子化状态, 在 502nm 光照情况下发绿光.

我们根据非天然氨基酸的理化性质, 理性地设计出了 pK_a 降低的绿色荧光蛋白 GFP, 黄色荧光蛋白 YFP 以及光转化荧光蛋白 mEOS2 突变体. 由于这种策略在 GFP、YFP、mEOS2 中都适用, 验证了此种方法的普遍可行性. 传统的进化酶或蛋白质的方式是通过在酶活中心或附近做定点突变库, 或者易错 PCR 来引入随机突变. 这往往需要很大的库容量以及合适的筛选策略. 而这种根据氨基酸性质定点引入突变的理性设计提高了目标的靶向性.

在动脉粥样硬化及冠心病患者的高密度脂蛋白中检测到高水平的 ApoA1 酪氨酸残基氯代^[3]. 从 ApoA1 结构上来看, 192 位 Tyr 在 2 个 α 螺旋之间的铰链区, 处于与溶液接触的亲水区域, 使其容易被髓过氧化物酶氯代氧化, 从而影响了胆固醇从血

管壁到血液的 ATP 结合盒式转运 A1 途径 (ABCA1), 导致动脉粥样硬化等疾病^[17]. 目前有实验研究, 在体外通过髓过氧化物酶催化次氯酸氧化 ApoA1, 发现 192 位酪氨酸被氯代, 以及甲硫氨酸被氧化, 但是通过用不能被氯代氧化的苯丙氨酸取代 192 位酪氨酸, 以及用还原剂还原甲硫氨酸, 可以部分地恢复 ApoA1 的胆固醇转运功能, 证明 ApoA1 的功能损伤与 192 位酪氨酸氯代以及甲硫氨酸氧化有关^[18]. Smith 在 ApoA1 上用苯丙氨酸取代酪氨酸, 通过次氯酸氧化同样发现了 ApoA1 的功能损伤^[9]. 由于目前对 ApoA1 氧化损伤的研究主要是采用次氯酸氧化, 以及位点突变的方法, 由于次氯酸氧化不具有位点特异性, 以及除了可以氧化酪氨酸以外, 还可以氧化甲硫氨酸、赖氨酸等氨基酸, 这样往往导致非特异性, 从而为研究 ApoA1 氯代氧化与功能损伤的关系带来困难. 而位点突变的方法不能提供酪氨酸氯代带来蛋白质氧化损伤的直接证据. 我们通过扩展基因密码的方法, 可以在蛋白质给定位点特异性引入 3-Cl-Tyr, 从而为 ApoA1 蛋白氯代氧化损伤研究提供了新的方法.

我们推断, ApoA1 192 位酪氨酸氯化引起的功能损伤与 3-Cl-Tyr 具有较低的 pK_a 有关, 在将来的研究中, 我们还将通过这种方法, 将 ApoA1 192 位 Tyr 替换为 3-Cl-Tyr, 并与野生型 ApoA1 的结构功能相比较, 从而解析酪氨酸氯代与功能关系, 并研究氯代 ApoA1 介导的胆固醇反向运输, 提供酪氨酸氯代与胆固醇反向运输障碍的新方法和直接证据.

总之, 我们进化出了可以位点特异性插入 3-Cl-Tyr 的氨酰 tRNA 合成酶, 为体内外研究蛋白质氯代损伤提供了新的方法. 我们通过荧光活性中心氯代, 得到了具有更低 pK_a , 以及荧光波谱有红移的突变体. 这些突变体将有可能成为标记溶酶体、吞噬酶体(内部 pH 4~5)等酸性细胞器的合适荧光蛋白. 这种理性设计进化荧光蛋白方法, 突破了传统定向进化中突变库容量和筛选策略的限制, 引入了带有新性质的非天然氨基酸, 为酶和蛋白质定向进化提供了新的思路.

参 考 文 献

- [1] Choi DK, Pennathur S, Perier C, *et al.* Ablation of the inflammatory enzyme myeloperoxidase mitigates features of Parkinson's disease in mice. *J Neurosci*, 2005, **25**(28): 6594-6600
- [2] Aldridge R E, Chan T, van Dalen C J, *et al.* Eosinophil peroxidase produces hypobromous acid in the airways of stable asthmatics.

- Free Radic Biol Med, 2002, **33**(6): 847–856
- [3] Heinecke J W. Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis. *Am J Cardiol*, 2003, **91**(3A): 12A–16A
- [4] Shao B, Bergt C, Fu X, *et al.* Tyrosine 192 in apolipoprotein A-I is the major site of nitration and chlorination by myeloperoxidase, but only chlorination markedly impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *J Biol Chem*, 2005, **280**(7): 5983–5993
- [5] Peng D Q, Wu Z, Brubaker G, *et al.* Tyrosine modification is not required for myeloperoxidase-induced loss of apolipoprotein A-I functional activities. *J Biol Chem*, 2005, **280**(40): 33775–33784
- [6] Reid B G, Flynn G C. Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry*, 1997, **36**(22): 6786–6791
- [7] Ni H M, Bockus A, Wozniak A L, *et al.* Dissecting the dynamic turnover of GFP-LC3 in the autolysosome. *Autophagy*, 2011, **7**(2): 188–204
- [8] Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy*, 2007, **3**(5): 452–460
- [9] Baird G S, Zacharias D A, Tsien R Y. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(22): 11984–11989
- [10] Patterson G, Day R N, Piston D. Fluorescent protein spectra. *J Cell Sci*, 2001, **114**(Pt 5): 837–838
- [11] McKinney S A, Murphy C S, Hazelwood K L, *et al.* A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nat Methods*, 2009, **6**(2): 131–133
- [12] Wang L, Brock A, Herberich B, *et al.* Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science*, 2001, **292**(5516): 498–500
- [13] Wang J, Zhang W, Song W, *et al.* A biosynthetic route to photoclick chemistry on proteins. *J Am Chem Soc*, 2010, **132**(42): 14812–14818
- [14] Tsien R Y. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**: 509–544
- [15] Faleev N G, Axenova O V, Demidkina T V, *et al.* The role of acidic dissociation of substrate's phenol group in the mechanism of tyrosine phenol-lyase. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1647**(1–2): 260–265
- [16] Nienhaus K, Nienhaus G U, Wiedenmann J, *et al.* Structural basis for photo-induced protein cleavage and green-to-red conversion of fluorescent protein EosFP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(26): 9156–9159
- [17] Ajees A A, Anantharamaiah G M, Mishra V K, *et al.* Crystal structure of human apolipoprotein A-I: insights into its protective effect against cardiovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(7): 2126–2131
- [18] Shao B, Oda M N, Bergt C, *et al.* Myeloperoxidase impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux through methionine oxidation and site-specific tyrosine chlorination of apolipoprotein A-I. *J Biol Chem*, 2006, **281**(14): 9001–9004

Fluorescent Protein Engineering Through Genetic Incorporation of 3-Chlorotyrosine*

ZHANG Wei¹⁾, WANG Yue-Qi²⁾, WANG Jiang-Yun^{1)**}

¹⁾ *Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;*

²⁾ *School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)*

Abstract Posttranslational chlorination of tyrosine residues in proteins produce 3-chlorotyrosine (3-Cl-Tyr), which is associated with several diseases, including Alzheimer's disease, asthma, atherosclerosis and acute myocardial infarction. High level of 3-chlorotyrosine has been found in ApoA1 protein in atherosclerosis patients, indicating that it may play important role in disease. Here we report a new method to facilitate the site-specific incorporation of 3-chlorotyrosine into proteins at specific sites. Such a new method may be very useful to probe the regulatory role of tyrosine chlorination in protein function. Compared to tyrosine (Tyr), 3-Cl-Tyr has lower pK_a . We replaced the green fluorescent protein (GFP) and photoactivatable protein mEOS2 chromophore Tyr (Tyr66 in GFP) by 3-Cl-Tyr, lowering the chromophore pK_a to 4.2 and 4.7, respectively. These mutant fluorescent proteins with lower pK_a may be advantageous for labeling proteins in acidic organelles such as lysosome and phagosome.

Key words GFP, unnatural amino acid, genetic code expansion

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00299

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China(30870592, 90913022).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64852570, E-mail: jwang@ibp.ac.cn

Received: July 2, 2011 Accepted: October 18, 2011