

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.15.002

RNA 编辑蛋白 OTP82 的表达与纯化*

陈丽 吴炳男 黄晨 肖树 陆昌瑞 何创龙 陈婷[△]

(东华大学 化学化工与生物工程学院 上海 201600)

摘要 目的:利用原核系统表达 RNA 编辑蛋白 OTP82,通过蛋白变复性的方法得到全长蛋白,并优化实验条件提高 OTP82 的收率。**方法:**利用原核表达系统表达 OTP82 全长融合蛋白(HSO),表达后的菌体用高压细胞破碎仪匀浆后收集包涵体并用包涵体洗涤液重复洗涤两遍,然后用含有 8 M 尿素的变性缓冲液将包涵体搅拌溶解得到蛋白原始液。将蛋白原始液复性后采用镍柱亲和纯化,通过 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测等方法对 HSO 的变复性结果进行筛选。**结果:**通过对复性缓冲液中盐浓度、谷胱甘肽的浓度和比例以及小分子添加剂的探索,得到了 OTP82 融合蛋白适合的变复性条件(pH 8.5 100 mM Tris, 400 mM NaCl, 200 mM 精氨酸, 5 mM GSH, 0.5 mM GSSG, 6 mM β -环糊精, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF)复性率达到 2.73%(获得蛋白 0.42 mg/L)。**结论:**通过变复性的方式能够在体外得到 OTP82 的粗蛋白,为揭示 RNA 编辑蛋白作用机制提供基础实验依据,为后续利用 PPR 蛋白进行工程蛋白设计奠定了基础。

关键词:PPR 蛋白;RNA 编辑;OTP82;蛋白纯化

中图分类号:Q-33;Q78;Q591 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)15-2807-06

Expression and Purification of RNA Editing Protein OTP82*

CHEN Li, WU Bing-nan, HUANG Chen, XIAO Shu, LU Chang-rui, HE Chuang-long, CHEN Ting[△]

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai, 201600, China)

ABSTRACT Objective: Express the RNA editing protein OTP82 by the prokaryotic system to, obtain the full-length protein by protein denaturation and renaturation, and optimize the experimental conditions to increase the yield of OTP82. **Methods:** The OTP82 full-length fusion protein (HSO) was expressed by a prokaryotic expression system. The expressed bacterial cells were crushed under high pressure, then collected the inclusion body. Washed the collected inclusion body twice with washing solution, and then dissolved it with the denaturation buffer containing 8 M urea to obtain the original protein solution. Purified the protein after refolding with nickel columns. The results of denaturation and renaturation of OTP82 full-length fusion protein (HSO) were screened by SDS-PAGE and Western-blot detection. **Results:** Through the exploration of the concentration of sodium chloride, the concentration and ratio of glutathione, and small molecule additives in the refolding buffer, obtained suitable denaturation conditions for HSO protein (pH 8.5 100 mM Tris, 400 mM NaCl, 200 mM Arginine, 5 mM GSH, 0.5 mM GSSG, 6 mM β -Cyclodextrin, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF) and reproduction rate reached 2.73% (0.42 mg/L). **Conclusion:** The crude protein of OTP82 can be obtained in vitro by denaturation, which provides a basic experimental basis for revealing the mechanism of action of RNA editing protein and lays the foundation for subsequent engineering protein design using PPR protein.

Key words: PPR protein; RNA editing; OTP82; Protein purification

Chinese Library Classification (CLC): Q-33; Q78; Q591 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)15-2807-06

前言

在真核生物中,PPR 蛋白是一类广泛分布的 RNA 编辑蛋白,通过转录后修饰参与调节植物的生长和发育等重要的生理过程^[1]。在植物线粒体与叶绿体中主要的 RNA 编辑蛋白类型是 PPR 蛋白中的 DYW 亚子类^[2,3]。OTP82 是典型的 DYW 亚类蛋白,全长为 823 个氨基酸,N 端含有 13 个串联重复的识别模体(PPR 模体)具有识别底物 RNA 的功能;C 端含有高度保守的蛋白质结构域:E1、E2、和 DYW 结构基序^[4]。由于野生型 PPR 蛋白存在 N 端重复序列多、分子量较大等特点,使用体外表达

系统很难获得高纯度的可溶性蛋白,导致 PPR 全长蛋白的结构与功能关系无法取得突破。包涵体的变复性技术具有成本低、操作简单、周期短等优点,且常被作为可溶性较差蛋白的纯化手段^[5]。现有的研究表明通过改变蛋白复性过程中小分子物质的添加以及氧化还原条件等,能提高可溶性蛋白的产率^[6]。

本文以野生型 OTP82 为研究对象,采用 ppSUMO 原核表达系统,获得 His-SUMO-OTP82 融合蛋白(简称 HSO)的包涵体。通过优化复性方法、稀释比例以及缓冲体系等条件,获得可溶性 HSO,为后续 OTP82 结构研究奠定基础。

* 基金项目:上海市科学技术委员会国际合作计划项目;(19410711000);上海市科学技术委员会自然科学基金项目(19ZR1471100)

作者简介:陈丽(1995-),女,硕士,研究方向:蛋白质工程,E-mail:ChenLiDHU@163.com

[△] 通讯作者:陈婷(1974-),女,副教授,研究方向:蛋白质工程,E-mail:chenting@dhu.edu.cn

(收稿日期:2022-01-28 接受日期:2022-02-23)

1 材料与方法

1.1 材料

磁力搅拌器 (QILINBEIER); Western 转膜仪 (Tanon, Bio-Rad); Chemi DocTMXRS+ (Tanon, Bio-Rad); 高压细胞破碎仪 (广州聚能纳米生物); AKTA start (GE Health)。pp-SUMO-OTP82 质粒, BL21(DE3)感受态细胞均为实验室自有保存; 分子筛柱 (Hiload 16/60 Superdex 200 prep grade) 购于上海业力生物科技有限公司; Ni-TED 6FF 琼脂糖纯化树脂、L-精氨酸和 β -环糊精购于 BBI 生命科学有限公司; Tris、DTT、NaCl、甘油、尿素、盐酸胍、EDTA 和 PMSF 等购于生工生物工程(上海)股份有限公司; 水为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 外源蛋白的诱导表达 将 ppSUMO-OTP82 质粒转入 BL21(DE3)感受态细胞后, 挑取单克隆菌株接入含卡那霉素的 LB 培养基中过夜培养, 将过夜培养的菌液 1:1000 接入卡那霉素及氯霉素双抗性 LB 培养基中, 37 °C 扩大培养至 OD₆₀₀=0.6 时加入 0.1 mM IPTG 诱导, 16 °C 表达 16 h。表达后 4000 r/min 离心 25 min 收集菌体。

1.2.2 蛋白原始液的制备 在 4 °C 将表达后的菌体用 Buffer A 1:40 重悬, 100:1 加入 PMSF, 1300 MPa 高压破碎三遍后 15000 r/min 离心 30 min 收集沉淀, 用包涵体洗涤缓冲液 40:1 将沉淀重悬后 14000 r/min 离心 10 min, 重复洗涤两遍。用 8 M 尿素缓冲液按照 1:20 的比例将沉淀搅拌溶解, 室温 15000 r/min 离心 25 min 后的上清即为蛋白原始液, 4 °C 保存。

1.2.3 蛋白原始液的纯化 将分子筛柱 (Hiload 16/60 Superdex 200 prep grade) 置于室温, 用 8 M 尿素缓冲液以 1 mL/min 的速度进行清洗 2 CV。加入蛋白原始液样品 3 mL, 在室温下以 1 mL/min 的速度用 8 M 尿素缓冲液进行洗脱。根据 280 nm 的蛋白紫外吸收峰图对样品进行 SDS-PAGE 检测后收集得到 HSO 融合蛋白。

1.2.4 蛋白复性 将复性缓冲体系在 4 °C 预冷后置于冰上, 加入终浓度 1 mM PMSF, 以 1:100 的比例把蛋白原始液缓慢滴加到复性缓冲液中, 低速搅拌 16 h。

1.2.5 复性蛋白的亲纯化 在 4 °C 条件下将复性后的蛋白缓冲液用 Ni-TED 亲和介质进行纯化, 使用 5 CV 无咪唑的蛋白漂洗液进行清洗平衡, 2 CV 高浓度咪唑 (250 mM) 的蛋白洗脱液进行洗脱, 然后将蛋白洗脱液 3800 rpm 浓缩后进行 SDS-PAGE 检测分析。

2 结果

2.1 融合蛋白 HSO 的表达与变性

ppSUMO 系统通过将目的基因融合在 SUMO 之后, 提高目的基因的可溶性表达, 而且该系统表达产物具有 HIS 标签, 后续可以通过 Ni 柱亲和纯化实现目标蛋白富集。由于 OTP82 N 端具有较多重复基序, 较难进行原核系统的制备, 为简化纯化步骤选用了 ppSUMO 原核表达系统以提高 HSO 融合蛋白的表达量。含重组质粒的 BL21(DE3), 在 0.1 mM IPTG, 16 °C 诱导表达 16 h 后, 收集菌体并匀浆, 把表达和离心过程中每步

操作的蛋白样品都进行 SDS-PAGE 电泳检测。试验结果显示大部分的融合蛋白 HSO 都在沉淀中。

通过 Image Lab 对沉淀样品 (PE) 中的融合蛋白 HSO 进行灰度分析, 发现沉淀中的 HSO 蛋白占比可达 (22.6%), 虽然有部分降解, 但可以尝试蛋白变复性的方法获得目标蛋白 (图 1)。为了使试验结果更加地准确, 后续所有的试验均使用 Image Lab 对结果进行灰度分析。

采用 50 mM NaCl 和 1 M 尿素的包涵体洗涤缓冲液对包涵体 (1:40) 进行洗涤后, 直接用 8 M 尿素进行蛋白变性。试验结果显示在这一洗涤条件下, 包涵体中大量杂蛋白被除去, 经 8 M 尿素变性, 获得的可溶性目标蛋白占比 30.2% (图 2)。

2.2 融合蛋白 HSO 的复性

2.2.1 融合蛋白 HSO 的复性与初步纯化 根据文献选择稀释法 (1:100) 进行蛋白复性, 复性缓冲液 (pH 8.5 100 mM Tris, 400 mM 精氨酸, 2 mM EDTA, 5 mM GSH, 0.5 mM GSSG, 1 mM PMSF), 4 °C 复性蛋白 15 h, 并通过 Ni 柱亲和纯化观察复性后的目标蛋白得率, 通过 Image Lab 的灰度分析, 洗脱液样品 (图 3 Lin 10) 中的目标融合蛋白 HSO 浓度约为 0.32 mg/L, 说明可以通过这一复性方式获得可溶性目标融合蛋白 HSO。

2.2.2 复性条件的优化 为了进一步提高融合蛋白 HSO 的复性浓度, 根据文献, 对复性缓冲液的盐离子浓度、氧化还原剂浓度及小分子条件进行进一步优化。

(1) NaCl 浓度优化 复性缓冲液中适量的盐离子的存在会影响蛋白的状态。在复性缓冲体系中设置了四个 NaCl 浓度梯度, 分别是 0 mM、200 mM、400 mM 和 600 mM, 进行试验来对比得出融合蛋白 HSO 复性的最佳 NaCl 浓度。400 mM NaCl 的蛋白洗脱液样品中 HSO 蛋白浓度最高 (图 4 A), 说明在 400 mM 的 NaCl 浓度下 HSO 的复性效果最好, 通过灰度分析其 HSO 蛋白浓度是其余样品的两倍以上, 后续使用 400 mM NaCl 的复性缓冲液进行试验 (图 4 B)。

(2) GSH/GSSG 添加浓度及比例的优化 谷胱甘肽能够在蛋白复性过程中协助二硫键的正确配对, 提高蛋白复性的比例。GSSG 和 GSH 的浓度和比例对蛋白质复性的效果影响很大, 首先设置了四个浓度梯度 (1 mM/0.1 mM、3 mM/0.3 mM、5 mM/0.5 mM 和 7 mM/0.7 mM) 而且保持 GSH 与 GSSG 的比例为 10:1 (复性缓冲液中的比例), 复性得到的结果如图 5 A 所示。通过灰度分析得出 GSH/GSSG 四组样品 1/0.1、3/0.3、5/0.5 和 7/0.7 的 HSO 蛋白含量分别占总蛋白含量的 13.1%、13.2%、16.7% 和 15.9%。GSH/GSSG 5/0.5 的条件下得到 HSO 蛋白的产量要略高于其它条件, 而且其中 25-66.2 kDa 的杂蛋白的含量也更低, 所以谷胱甘肽的浓度选择 GSH/GSSG 5 mM/0.5 mM。保持 GSSG 的浓度 (0.5 mM) 不变, 改变 GSH/GSSG 的浓度比例, 设置 5 个梯度 (5:1、10:1、25:1、50:1 和 100:1), 得到的结果如图 5 B 所示。通过灰度分析得出 GSH/GSSG 四组样品 5:1、10:1、25:1、50:1 和 100:1 的 HSO 蛋白含量分别占总蛋白含量的 6.0%、6.6%、5.3%、4.6% 和 5.1%。10:1 的条件下得到的 HSO 蛋白产量要高于其它条件, 而且其中的杂蛋白含量也相对较少, 所以谷胱甘肽的比例选择 10:1。综上所述, 后续使用 GSH/GSSG 5 mM/0.5 mM 的复性缓冲液进行试验。

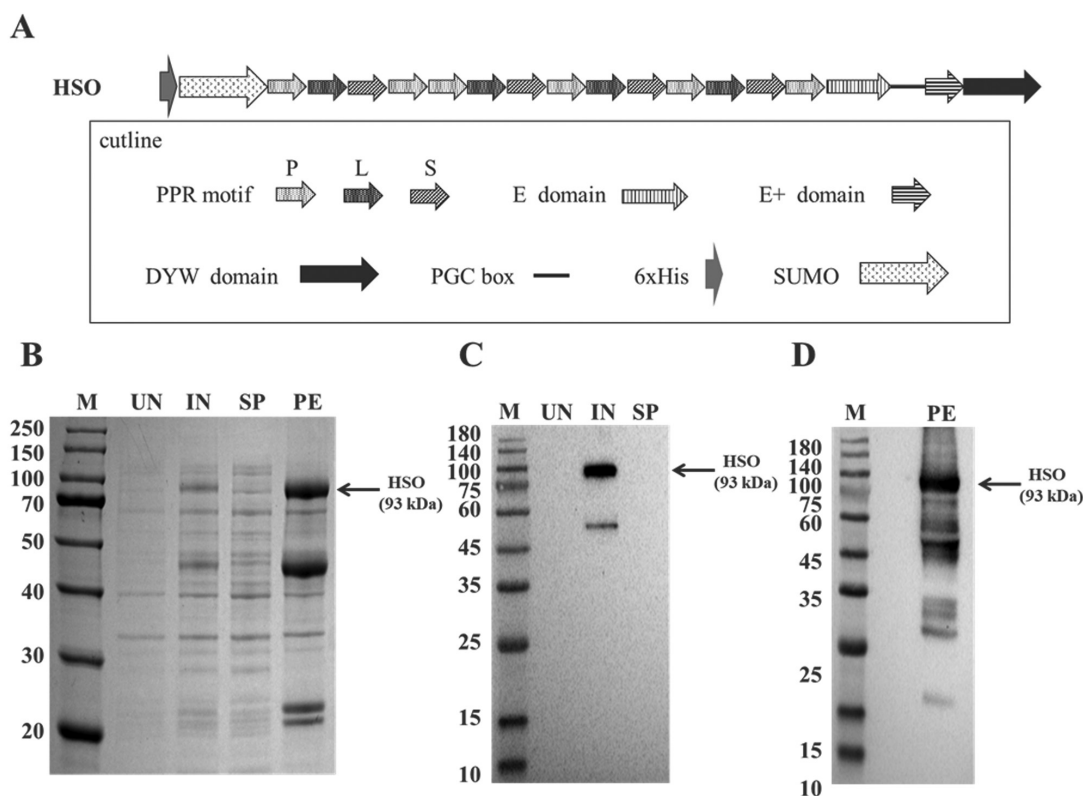


图 1 HSO 融合蛋白的表达

Fig.1 Protein expression of HSO fusion protein in BL21(DE3)

A: HSO 融合蛋白示意图; B: SDS-PAGE (12%) 图; C, D: Western-Blot 图; M: 蛋白分子量 marker; UN: 诱导前全细胞样品; IN: 诱导后全细胞样品; SP: 上清液样品; PE: 沉淀样品

A: Schematic diagram of HSO fusion protein; B: SDS-PAGE (12%); C, D: Western-Blot; M: marker; UN: ppSUMO-OTP82 uninduced; IN: ppSUMO-OTP82 induced; SP: supernatant; PE: precipitation

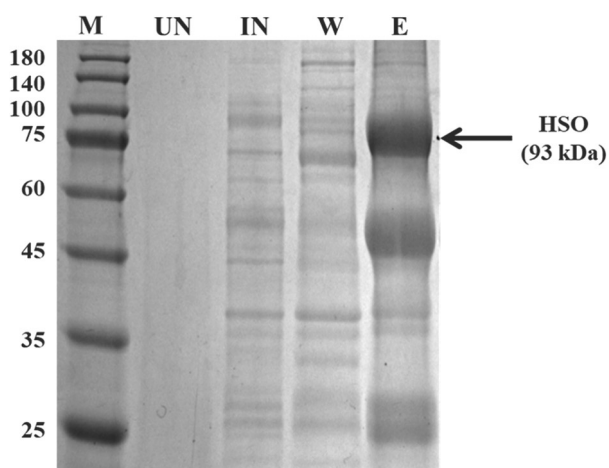


图 2 包涵体的洗涤与变性

Fig.2 Washing and denaturation of inclusion body

M: 蛋白分子量 marker; UN: 诱导前全细胞样品; IN: 诱导后全细胞样品; W: 包涵体洗涤缓冲液样品; E: 蛋白变性样品

M: marker; UN: ppSUMO-OTP82 uninduced; IN: ppSUMO-OTP82 induced; W: inclusion body wash buffer; E: HSO denatured fusion protein

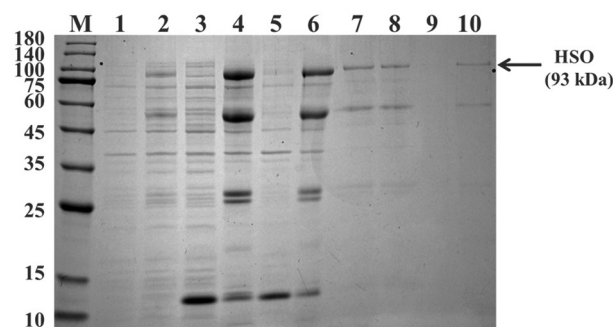


图 3 融合蛋白 HSO 的复性与亲和纯化

Fig.3 Refolding and purification of HSO fusion protein

M: 蛋白分子量 marker; 1: 诱导前全细胞样品; 2: 诱导后全细胞样品; 3: 上清液样品; 4: 沉淀样品; 5: 包涵体洗涤缓冲液样品; 6: 蛋白原始液样品; 7: 亲和前蛋白样品; 8: 亲和后穿液样品; 9: 蛋白漂洗液样品; 10: 蛋白洗脱液样品

M: marker; 1: ppSUMO-OTP82 uninduced; 2: ppSUMO-OTP82 induced; 3: supernatant; 4: precipitation; 5: inclusion body wash buffer; 6: HSO denatured fusion protein; 7: Refolding protein supernatant; 8: the flow through the refolding protein supernatant; 9: wash buffer; 10: elution buffer

(3) 小分子添加剂的优化 精氨酸: 基础复性缓冲体系中精氨酸的浓度为 400 mM, 所以试验以 400 mM 精氨酸为基础, 设置了共五个精氨酸浓度梯度, 分别是 0、200、400、600 和 800 mM, 复性得到的结果如图 6 A 所示。通过灰度分析得出 HSO

融合蛋白在各组样品中的含量分别为 8.0%、10.7%、1.9%、9.0% 和 10.2%, 其中 200 mM 组的蛋白复性样品中的 HSO 融合蛋白含量最高, 故决定采用精氨酸浓度为 200 mM 的复性缓冲

液。环糊精:环糊精的疏水性空腔结构能够帮助蛋白复性时正确折叠,所以在蛋白复性试验中经常被用作添加剂。由于环糊精分子量很大,在室温的溶解度也不超过 16.3 mM。因为蛋白需要在 4℃ 进行复性,环糊精在 4℃ 溶解度会更低。所以设置了 4 个环糊精浓度分别是 0、3、6 和 9 mM,复性得到的结果如

图 6 B 所示。通过灰度分析得出 HSO 融合蛋白在 0、3、6 和 9 mM 四组样品中的含量分别为 14.2%、16.2%、16.3% 和 14.9%,其中含有 6 mM β - 环糊精的蛋白复性样品中的 HSO 融合蛋白含量最高,故决定采用 6 mM β - 环糊精浓度的复性缓冲液。

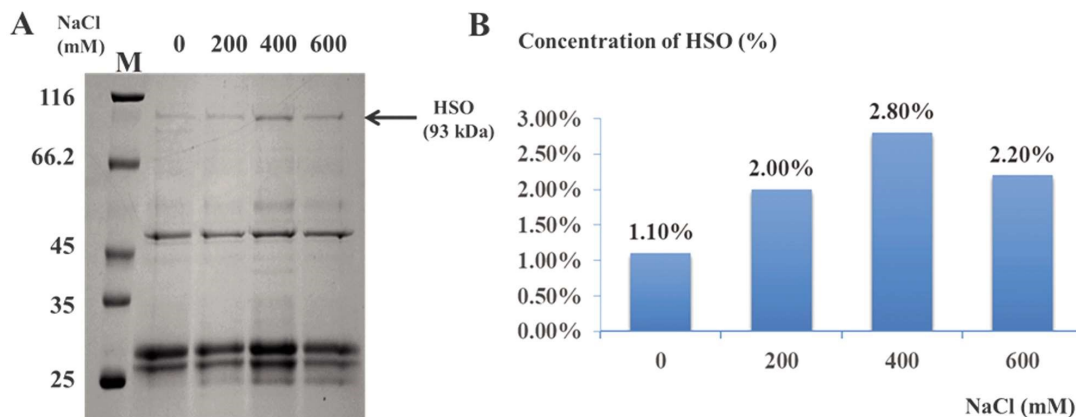


图 4 复性缓冲体系中 NaCl 浓度优化

Fig.4 Optimization of NaCl concentration in refolding buffer system

A: 12% SDS-PAGE; M: 蛋白分子量 marker; 其余为不同 NaCl 浓度的蛋白浓缩液样品; B: 蛋白样品灰度分析图

A: SDS-PAGE (12%); M: marker; The other lanes are renatured protein samples with different NaCl concentrations;

B: Grayscale analysis of protein samples

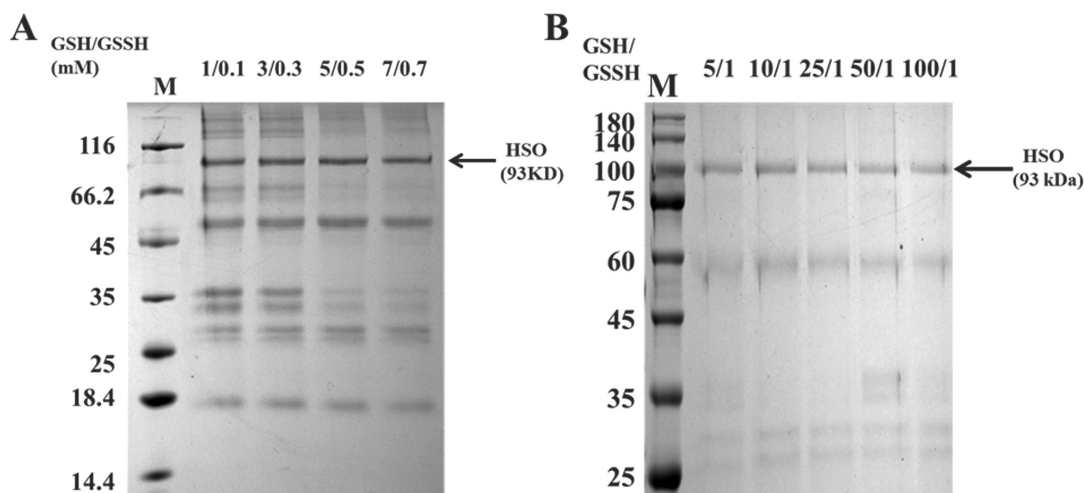


图 5 复性缓冲体系中 GSH/GSSG 添加浓度及比例的优化

Fig.5 Optimization of GSH/GSSG Addition Concentration and Ratio in Refolding Buffer System

A: 融合蛋白 HSO 的复性谷胱甘肽浓度探索 (12% SDS-PAGE); M: 蛋白分子量 marker; 其余为不同浓度的 GSH/GSSG 蛋白浓缩液样品; B: 融合蛋白 HSO 的复性谷胱甘肽比例探索 (12% SDS-PAGE); M: 蛋白分子量 marker; 其余为不同比例的 GSH/GSSG 蛋白浓缩液样品

A: Optimization of the renaturation glutathione concentration of the fusion protein HSO (12% SDS-PAGE); M: marker; The other lanes are renatured protein samples with different GSH/GSSG concentrations; B: Optimization of the renaturation glutathione ratio of the fusion protein HSO

(12% SDS-PAGE); M: marker; The other lanes are renatured protein samples with different GSH/GSSG ratio

2.3 融合蛋白 HSO 的纯化

2.3.1 蛋白原始液的纯化 将 2 L HSO 的表达菌株 BL21 (DE3) 表达后制作蛋白原始液,蛋白浓度为 4 mg/mL。为了提高 HSO 融合蛋白的纯度,在复性之前先对 8 M 尿素的蛋白原始液进行分子筛纯化,除去部分杂蛋白。分离后的 HSO 蛋白样品在紫外吸收峰图中有四个主要的峰(图 7 A),分别收集浓缩后进行检测。结果显示其中⑧号峰含有大量的目的蛋白(图 7

line 3), 而且出峰的位置与其分子量相匹配,说明⑧号峰的 HSO 蛋白是以单体的形式存在的。分子筛可以去除 HSO 蛋白原始液中大部分的小分子蛋白杂质(<35 kDa)(图 7 line 4)。

2.3.2 HSO 的复性及纯化 将纯化后的 HSO 变性蛋白进行最优条件的复性:用 50 mM NaCl 和 1 M 尿素的缓冲液洗涤包涵体,8 M 尿素直接变性蛋白,将蛋白原始液以 1:100 的比例直接稀释到 100 mM Tris (pH 8.5),400 mM NaCl,200 mM 精氨

酸, 5 mM GSH, 0.5 mM GSSG, 6 mM β -环糊精, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF 的缓冲体系中 4 °C 复性 15 h 最后进行 Ni 柱纯化。蛋白洗脱液的蛋白浓度约为 0.42 mg/mL, 通过灰度分析其

中 HSO 融合蛋白的含量约为蛋白总含量的 15%, 经过计算 HSO 融合蛋白的产率约为 2.73%。

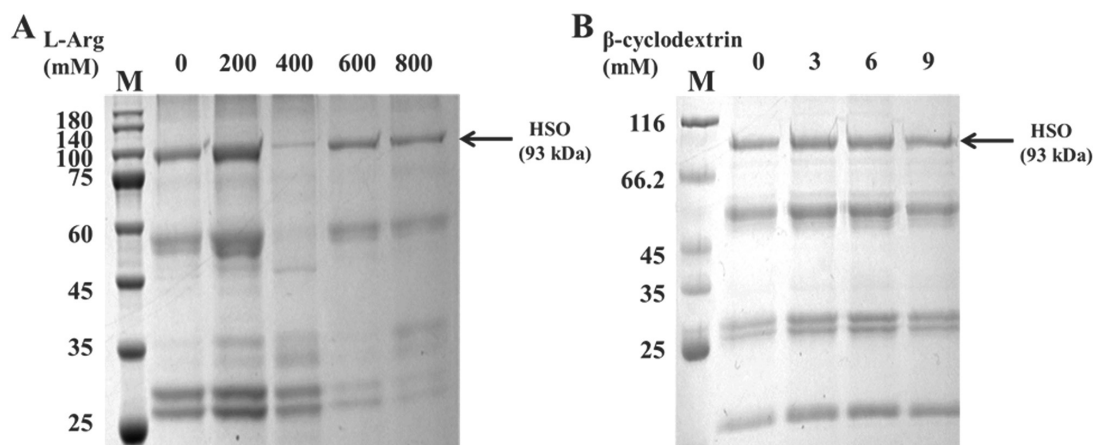
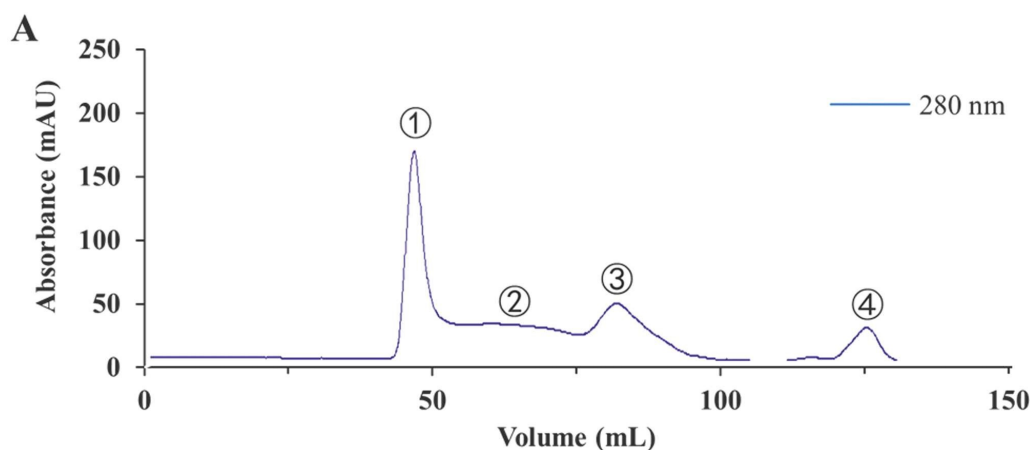


图 6 复性缓冲液中小分子物质浓度优化

Fig.6 Optimization of the concentration of small molecules in the refolding buffer

A: 复性缓冲液体系中精氨酸浓度优化 SDS-PAGE(12%)图; M: 蛋白分子量 marker; 其余为不同精氨酸浓度的蛋白浓缩液样品; B: 复性缓冲液体系中环糊精浓度优化 SDS-PAGE(12%)图; M: 蛋白分子量 marker; 其余为不同环糊精浓度的蛋白浓缩液样品

A: Optimization the concentration of arginine in the refolding buffer system SDS-PAGE (12%); M: marker; The other lanes are renatured protein samples with different arginine concentrations; B: Optimized the concentration of cyclodextrin in the refolding buffer system SDS-PAGE (12%); M: marker; The other lanes are renatured protein samples with different cyclodextrin concentrations



B

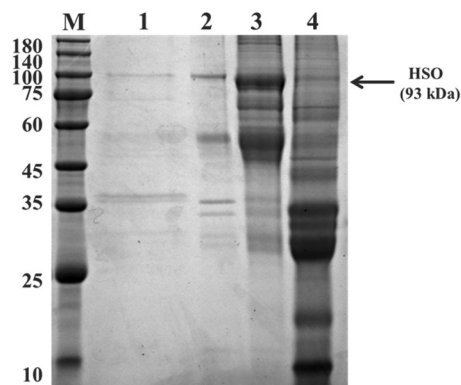


图 7 HSO 融合蛋白层析图

Fig.7 HSO fusion protein chromatogram

A: 融合蛋白 HSO 分子筛层析紫外吸收峰图; B: SDS-PAGE(12%)图; M: 蛋白分子量 marker; 1-4: 依次为①、②、③和④号峰的蛋白样品

A: Protein chromatography UV absorption peak; B: SDS-PAGE (12%); M: marker; 1-4: Protein samples of peaks ①, ②, ③ and ④

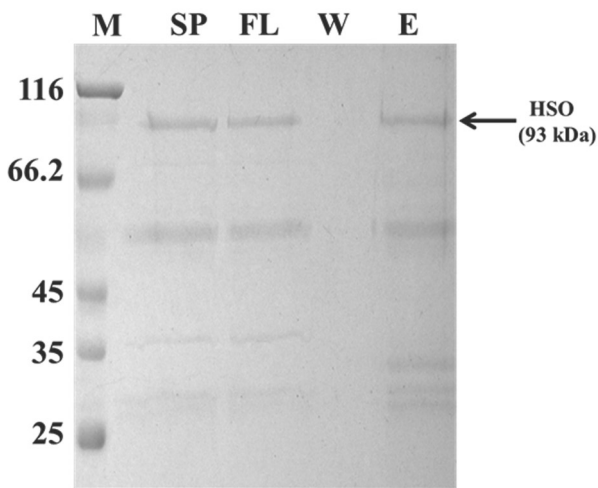


图8 融合蛋白 HSO 的亲纯化

Fig.8 Purification of fusion protein HSO

M: 蛋白分子量 marker; SP: 上清液样品; FL: 亲和后蛋白样品; W: 蛋白漂洗液样品; E: 蛋白洗脱液样品

M: marker; SP: Refolding protein supernatant; FL: the flow through the refolding protein supernatant; W: wash buffer; E: elution buffer

3 讨论

PPR 基因是一个很大的基因家族,在拟南芥、谷子、杨树、玉米和水稻等植物中发现了 400 多个 PPR 蛋白^[7-11]。PPR 蛋白是重要的 RNA 结合蛋白,可通过影响细胞器 mRNA 转录物的表达,参与调节植物的生长和发育^[1]。在线粒体、叶绿体和细胞核中参与 RNA 编辑、RNA 剪接和 RNA 加工等转录后基因调节过程,对细胞器的稳定性(包括生物发生)和功能产生重要影响^[7,12-14]。植物中的 RNA 编辑是必不可少的,许多突变体在编辑缺失后表现出致病性甚至是致死性^[15]。

PPR 蛋白的特征是蛋白质 N 端含有串联重复的识别模体,具有识别底物 RNA 的功能^[7],因此对设计识别特定 RNA 底物的人工 PPR 蛋白具有潜在应用价值。根据识别模体的长短不同又分为三类识别模体分别是 P、L 和 S。依据模体组成的不同,PPR 蛋白又分为 P 和 PLS 亚家族,其特征是 P 类只含有 P 模体,而 PLS 类含有 P、L 和 S 三种模体。其中 P 亚类 PPR 蛋白在广泛的细胞器 RNA 代谢、基因表达^[13,16]和翻译过程中扮演着重要的角色^[17]。PLS 类蛋白的 C 端含有蛋白质结构域:E1、E2、和 DYW,但它们在 RNA 编辑过程中的确切功能尚不清楚^[18],而且 PLS 类蛋白几乎只在 C 到 U 的 RNA 编辑中起作用^[19]。DYW 结构域末端经常出现类似于保守的胞苷脱氨酶的模体序列,所以它被用其末端的保守天冬氨酸(D)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)残基命名,部分缺乏 DYW 结构域的 PPR 蛋白,需要与其他含有 DYW 结构域的反式作用编辑因子合作完成 RNA 的编辑^[20]。

蛋白的全长对于其功能的研究是至关重要的,OTP82 蛋白作为 PPR 蛋白家族中典型的 RNA 编辑蛋白,其 N 端含有较多重复序列的植物蛋白,把 OTP82 基因克隆到 ppSUMO 表达载体中,通过原核表达系统表达出的 OTP82 融合蛋白全长 823 个氨基酸,理论分子量约为 93 kDa。在原核表达系统中制备的重组 OTP82 蛋白存在可溶性差的现象,无法获得高纯度且有

活性的 OTP82。所以对 OTP82 的整体结构与功能的关系尚未有明确的报道。因此本文以 OTP82 融合蛋白(HSO)作为研究对象,通过变复性的方法对 HSO 融合蛋白试验条件优化后得到的包涵体变复性条件为:在 4 °C 条件下,洗涤缓冲液(50 mM NaCl 和 1 M 尿素)将包涵体洗涤后用 8 M 尿素溶液按照 1/20 g/mL 的比例,搅拌 12 h 完全溶解包涵体。以 1:100 的投料比例直接将蛋白原始液稀释到优化后的复性缓冲液(pH 8.5 100 mM Tris, 400 mM NaCl, 200 mM 精氨酸, 5 mM GSH, 0.5 mM GSSG, 6 mM β-环糊精, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF)中,4 °C 复性 15 h。在此条件下最终得到了 HSO 的粗蛋白,其产率大约为 2.73%,为获得全长 RNA 编辑蛋白提供新途径。对 RNA 编辑蛋白作用机制的研究不仅有利于认识这一重要生理过程,而且为设计体外核酸编辑蛋白提供了可能。

参考文献(References)

- [1] Subburaj S, Tu L H, Lee K, et al. A Genome-Wide Analysis of the Pentatricopeptide Repeat (PPR) Gene Family and PPR-Derived Markers for Flesh Color in Watermelon (*Citrullus lanatus*) [J]. *Genes*, 2020, 11(10): 1125
- [2] Sugita M, Ichinose M, Ide M, et al. Architecture of the PPR gene family in the moss *Physcomitrella patens* [J]. *RNA Biology*, 2013, 10(9): 1439-1445
- [3] Wagoner J A, Sun T, Lin L, et al. Cytidine deaminase motifs within the DYW domain of two pentatricopeptide repeat-containing proteins are required for site-specific chloroplast RNA editing [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(5): 2957-2968
- [4] Cheng S F, Gutmann B, Zhong X, et al. Redefining the structural motifs that determine RNA binding and RNA editing by pentatricopeptide repeat proteins in land plants [J]. *The Plant Journal*, 2016, 85(4): 532-547
- [5] Ye X L, Yu D, Wu Y Z, et al. An efficient large-scale refolding technique for recovering biologically active recombinant human FGF-21 from inclusion bodies [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 135: 362-372
- [6] 贾长虹, 卢育红. 人工伴侣条件下谷胱甘肽浓度对溶菌酶复性的影响[J]. *青岛大学学报(工程技术版)*, 2007(02): 78-83
- [7] Lurin C, Andres C, Aubourg S, et al. Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(8): 2089-2103
- [8] Xing H T, Fu X K, Yang C, et al. Genome-wide investigation of pentatricopeptide repeat gene family in poplar and their expression analysis in response to biotic and abiotic stresses [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1-9
- [9] Liu J M, Xu Z S, Lu P P, et al. Genome-wide investigation and expression analyses of the pentatricopeptide repeat protein gene family in foxtail millet[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 1-16
- [10] Chen L, Li Y X, Li C H, et al. Genome-wide analysis of the pentatricopeptide repeat gene family in different maize genomes and its important role in kernel development [J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 1-14
- [11] Laluk K, AbuQamar S, Mengiste T. The Arabidopsis mitochondria-localized pentatricopeptide repeat protein PGN functions in defense against necrotrophic fungi and abiotic stress tolerance[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(4): 2053-2068

(下转第 2840 页)

- Receptor (IL-6R) Monoclonal Antibody, and Future Combination Therapies for Severe COVID-19 [J]. *Med Sci Monit*, 2021, 27: e933973
- [21] Lotan I, McGowan R, Levy M. Anti-IL-6 Therapies for Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: A Systematic Review of Safety and Efficacy[J]. *Curr Neuroparmacol*, 2021, 19(2): 220-232
- [22] Kerschbaumer A, Smolen JS, Dougados M, et al. Pharmacological treatment of psoriatic arthritis: a systematic literature research for the 2019 update of the EULAR recommendations for the management of psoriatic arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79(6): 778-786
- [23] Tanaka R, Ichimura Y, Kubota N, et al. Activation of CD8 T cells accelerates anti-PD-1 antibody-induced psoriasis-like dermatitis through IL-6 [J]. *Commun Biol*, 2020, 3(1): 571
- [24] Peng L, Zhong J, Xiao Y, et al. Therapeutic effects of an anti-IL-6 antibody in fungal keratitis: Macrophage inhibition and T cell subset regulation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 85: 106649
- [25] Song H Y, Han J M, Byun E H, et al. Bombyx batryticatus Protein-Rich Extract Induces Maturation of Dendritic Cells and Th1 Polarization: A Potential Immunological Adjuvant for Cancer Vaccine [J]. *Molecules*, 2021, 26(2): 476
- [26] Wang A, Bai Y. Dendritic cells: The driver of psoriasis [J]. *J Dermatol*, 2020, 47(2): 104-113
- [27] Nguyen T, Lestienne F, Cousy A, et al. Effective inhibition of Th17/Th22 pathway in 2D and 3D human models of psoriasis by Celastrol enriched plant cell culture extract [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2020, S6: 3-9
- [28] Jiang Q, Yang G, Xiao F, et al. Role of Th22 Cells in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 688066
- [29] Miao X, Xiang Y, Mao W, et al. TRIM27 promotes IL-6-induced proliferation and inflammation factor production by activating STAT3 signaling in HaCaT cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 318(2): C272-C281
- [30] 李伟, 段丽华. AEG1 蛋白在结肠癌细胞中表达异常及其调控 IL-6/STAT3 通路影响结肠癌增殖和凋亡的机制研究[J]. *免疫学杂志*, 2020, 36(5): 404-409

(上接第 2812 页)

- [12] Hayes M L, Dang K N, Diaz M F, et al. A conserved glutamate residue in the C-terminal deaminase domain of pentatricopeptide repeat proteins is required for RNA editing activity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(16): 10136-10142
- [13] Ichinose M, Tasaki E, Sugita C, et al. A PPR-DYW protein is required for splicing of a group II intron of cox1 pre-mRNA in *Physcomitrella patens* [J]. *The Plant Journal*, 2012, 70(2): 271-278
- [14] Hao Y, Wang Y, Wu M, et al. The nuclear-localized PPR protein Os-NPPR1 is important for mitochondrial function and endosperm development in rice [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(18): 4705-4720
- [15] Chateigner-Boutin A L, Small I. Plant RNA editing [J]. *RNA biology*, 2010, 7(2): 213-219
- [16] Barkan A, Small I. Pentatricopeptide repeat proteins in plants [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2014, 65: 415-442
- [17] Uyttewaal M, Arnal N, Quadrado M, et al. Characterization of *Raphanus sativus* pentatricopeptide repeat proteins encoded by the fertility restorer locus for *Ogura* cytoplasmic male sterility [J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(12): 3331-3345
- [18] Schallenberg-Rüdinger M, Knoop V. Coevolution of organelle RNA editing and nuclear specificity factors in early land plants [J]. *Advances in Botanical Research*, 2016, 78: 37-93
- [19] Schmitz-Linneweber C, Small I. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression [J]. *Trends in Plant Science*, 2008, 13(12): 663-670
- [20] Guillaumot D, Lopez-Obando M, Baudry K, et al. Two interacting PPR proteins are major Arabidopsis editing factors in plastid and mitochondria [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(33): 8877-8882