

DOI:10.11784/tdxbz202505016

PINK1/Parkin-Ub 复合物的构建、表达与纯化

米立志, 刘徐佳, 秦晓红, 李炳轩, 孙慧敏, 邢一莹

(天津大学生命科学学院, 天津 300072)

摘要: PINK1 是定位于线粒体外膜的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在氧化损伤或膜电位崩溃时从线粒体基质转位至外膜, 经自磷酸化激活后催化泛素(Ub)生成 pSer65-Ub, 通过解除 Parkin 的自抑制构象以启动线粒体自噬, 其功能异常与帕金森氏症(Parkinson's disease, PD)等神经退行性疾病密切相关. PINK1 招募活化 Parkin 涉及“磷酸化-构象变构-泛素化”级联反应, 在细胞内受到精确调控, 但此关键途径的分子机制尚未阐明. 本研究创新性地构建基于循环排列增强型绿色荧光蛋白(cpEGFP)的 PINK1 活性分子探针 pParkin-cpEGFP-pUb, 通过将拟磷酸化突变的 Parkin(S65D)与 Ub(S65D)分别融合至 cpEGFP 的 N 端和 C 端, 利用激活态 PINK1 结合探针两端以诱导 cpEGFP 中 β -桶状结构重组并重新发出绿色荧光的原理, 实现复合物形成的实时监测. 本研究分别表达赤拟谷盗虫源 PINK1(*TcPINK1*)激活突变体 *TcPINK1*^{L552R}(135-570)及探针蛋白, 经亲和层析和分子筛层析纯化后, 两者以 2:1 摩尔比共孵育, 经 Superose 6 凝胶过滤层析显示复合物洗脱峰(13.3 mL)显著早于单一组分(15.1 mL 和 14.9 mL), Western-blot 证实峰内同时含 His 标签的 PINK1 激酶和麦芽糖结合蛋白(MBP)标签的探针组分. 通过 0.075%戊二醛在 4 °C 交联 10 min 稳定复合物构象, 负染电镜(Talos L120C)显示颗粒呈直径 15~20 nm 均一构象, 成功获得了 PINK1 与探针的稳定复合物, 并为后续研究 PINK1 激活与招募 Parkin 的分子机制提供了基于基因编码的荧光检测工具.

关键词: 帕金森氏症; PINK1/Parkin 通路; 循环排列荧光蛋白

中图分类号: Q71

文献标志码: A

文章编号: 0493-2137(2026)06-0641-11

Construction, Expression, and Purification of PINK1/Parkin-Ub Complex

Mi Lizhi, Liu Xujia, Qin Xiaohong, Li Bingxuan, Sun Huimin, Xing Yiying

(School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) is a serine/threonine protein kinase. It is localized to the mitochondrial outer membrane, but translocates from the mitochondrial matrix to the outer membrane upon oxidative damage or a collapse in the membrane potential. After autophosphorylation-mediated activation, PINK1 catalyzes the phosphorylation of ubiquitin (Ub) to generate pSer65-Ub, which releases the E3 ubiquitin-protein ligase (Parkin) from an autoinhibited conformation to initiate mitophagy. Dysfunctions in this process are strongly implicated in the pathogenesis of neurodegenerative disorders, including Parkinson's disease. The recruitment and activation of Parkin by PINK1 involves a “phosphorylation-conformational change-ubiquitination” cascade that is stringently regulated. However, the molecular mechanisms underlying the control of this critical pathway remain poorly understood. This study adopted a novel methodology by utilizing circularly permuted enhanced green fluorescent protein (cpEGFP) to create a PINK1 activity-sensing molecular probe, pParkin-cpEGFP-pUb, by fusing the phosphomimetic Parkin (S65D) and Ub (S65D) to the N- and C-termini of cpEGFP. The activated PINK1 bound to both ends of the probe, inducing a β -barrel restructuring of the cpEGFP and restoring green fluorescence, thereby enabling the real-time monitoring of complex formation. We expressed the hyperactive *Tribolium castaneum* PINK1 mutant (*TcPINK1*^{L552R}, residues

收稿日期: 2025-05-12; 修回日期: 2025-06-02.

作者简介: 米立志 (1968—), 男, 博士, 教授, lizhi.mi@tju.edu.cn.

通信作者: 秦晓红, qinxiaohong@tju.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31400645).

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31400645).

135-570) along with the probe. After purification via affinity and molecular sieve chromatography, co-incubation at a molar ratio of 2 : 1 yielded a complex with a distinct elution peak (13.3 mL) upon Superose 6 gel filtration, much earlier than the individual components (*Tc*PINK1^{L552R}; 15.1 mL; probe: 14.9 mL). Western blot confirmed the presence of His-tagged PINK1 and maltose binding protein (MBP)-tagged probe within the complex corresponding to the peak. Chemical cross-linking, achieved by treating with 0.075% glutaraldehyde for 10 min at 4 °C, resulted in particles with uniform conformations (15—20 nm in diameter), which were visualized using negative-stain electron microscopy (Talos L120C). A stable PINK1-probe complex was obtained, which provides a gene-encoded fluorescent tool for detecting the molecular mechanisms underlying the activation and recruitment of Parkin by PINK1 in further studies.

Keywords: Parkinson's disease; PINK1/Parkin pathway; circularly permuted fluorescent protein

帕金森氏症 (Parkinson's disease, PD) 是仅次于阿尔茨海默病的第 2 大神经退行性疾病, 全球的患病人数预计将从 2015 年的 700 万左右增至 2040 年的 1 300 万, 成为全球公共卫生的重大挑战, 我国帕金森氏症患者总数约占全球 1/2^[1]. PD 的病理特征包括黑质致密部多巴胺能神经元的进行性丧失和路易小体的异常聚集, 其发病机制与线粒体功能障碍、氧化应激、蛋白质稳态失衡密切相关^[2-4]. 近年来, 线粒体质量控制系统的失调被证实是 PD 的核心病理机制之一, 而 PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1)/Parkin (E3 ubiquitin-protein ligase) 通路作为线粒体自噬的核心调控者, 在清除受损线粒体中发挥关键作用^[5-7].

PINK1 是一种定位于线粒体外膜上的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶. 人源 PINK1 (*human* PINK1, *h*PINK1) 由 581 个氨基酸组成, 如图 1 所示. N 端存在线粒体定位信号 (mitochondria targeting sequence, MTS) 及内膜转移信号; 中间为丝氨酸/苏氨酸激酶结构域 (kinase domain, KD); C 端存在特殊的 C 末端结构域 (C-terminal domain, CTD), 参与激酶活性调节和线粒体外膜滞留. 在正常的线粒体中, PINK1 会被基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 和肽酰谷氨酰胺水解酶 (presenilin-associated rhomboid-like protein, PARL) 等酶切割, 形成约 52 kDa 的成熟形式, 而后在细胞质中被蛋白酶体识别降解, 因而生理条件下 PINK1 蛋白量很低, 难以被检测到. Parkin 是 E3 泛素连接酶, 包括 N 端泛素样结构域 (ubiquitin-like, Ubl)、中间独特的 RING0 (really interesting new gene 0) 锌指结构域以及 C 端 RING1-IBR-RING2 (RBR) 催化模块. Ubl 的 Ser65 可被 PINK1 磷酸化, 变构调节 Parkin 活性^[8]. 在稳态条件下, Parkin 维持自抑制状态: RING0 区域将泛素结合的催化位点 C431 掩藏起来; 此外, 位于 IBR 和 RING2 区域间一段的 α 螺旋结构, 阻断 RING1 区域的 E2 泛素结

合酶的相互作用位点.

当线粒体损伤或膜电位异常时, PINK1 聚集在线粒体外膜, 通过自磷酸化激活, 而后磷酸化泛素并招募活化胞质中的 Parkin^[9-10]. 磷酸化的泛素 Ub 和 Ubl 使 Parkin 的空间构象发生改变, 起催化作用的 C431 暴露, E3 泛素连接酶被活化 (图 1(d)). 活化的 Parkin 通过泛素化其他线粒体外膜蛋白, 形成围绕受损线粒体的隔离膜, 通过自噬途径清除整个被标记的线粒体^[11-14]. PINK1/Parkin 信号通路涉及到多种酶促反应, 具有动态性、瞬时性和高效性的特点, 使得研究 PINK1 招募活化 Parkin 的分子机制面临巨大挑战.

冷冻电子显微镜 (cryo-EM) 和 X 射线晶体学技术的进步为动态蛋白复合物的高分辨率结构解析提供了可能, 但是复合物的不稳定性仍是主要障碍. 2017 年, Kumar 等^[15]通过引入 S205E/E527A/K528A 突变, 同时截去位于 Ins3 上的 aa261-270, 稳定了蛋白构象, 解析了 *Tc*PINK1 激酶结构域的晶体结构. Schubert 等^[16]利用纳米抗体 Nb696, 稳定了酶与底物 Ub^{TVLN} 的结合, 首次解析了 *Ph*PINK1/Ub 复合物的晶体结构 (PDB: 6EQI), 揭示了激酶域 α C 螺旋的构象重排对 Ub 结合的促进作用. Parkin 的加入显著增加了稳定复合物获得的难度. PINK1 与 Parkin 的相互作用依赖于 PINK1 的特定构象及激酶活性, 而 Ub 和 Ubl 的磷酸化引起 Parkin 构象的剧烈变化, 会进一步增加复合物的构象异质性^[13-14].

当前帕金森氏症的临床治疗主要依赖多巴胺能药物 (如左旋多巴) 和深部脑刺激等手段, 这些方法能在一定程度上改善运动症状 (如震颤、强直、运动迟缓), 但无法阻止或逆转疾病的神经退行性进程^[2]. 长期药物治疗常伴随运动并发症 (如剂末现象、异动症) 和非运动症状的恶化, 且对疾病的核心病理机制即神经元的进行性丢失缺乏有效的干预作用^[17]. 开发能够延缓、阻止甚至逆转疾病进展的早期神经保护或疾病修饰疗法是当前帕金森氏症研究领域最紧迫的挑

战和亟待满足的医疗需求.

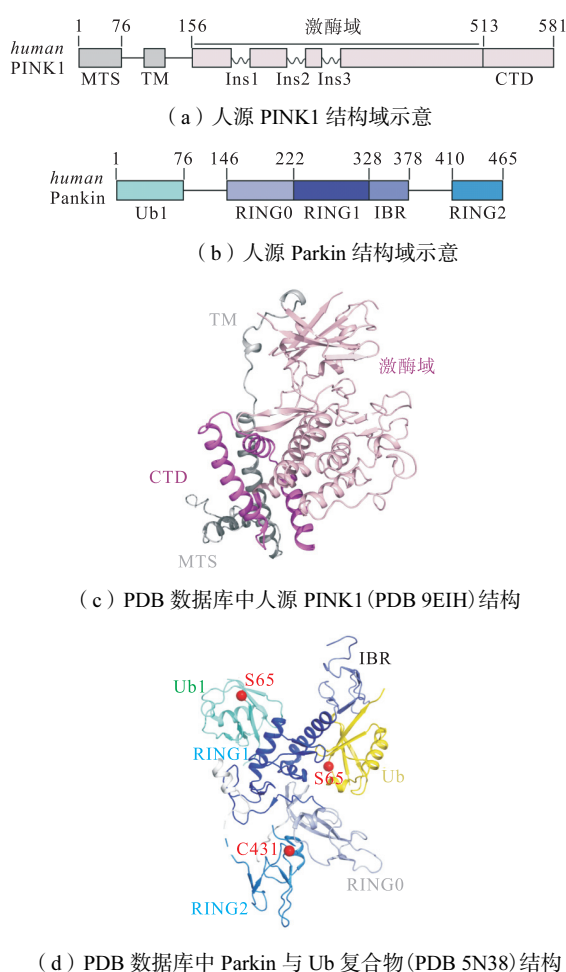


图 1 人源 PINK1、Parkin 结构示意

Fig.1 Structural diagrams of human PINK1 and human Parkin

近年来,构象敏感型荧光探针和化学交联技术的发展为动态复合物的捕获提供了新思路^[18]. 该类荧光探针是把增强型绿色荧光蛋白 EGFP 在 144/145 氨基酸位点切割后,将 N 端/C 端片段调转形成循环排列增强型绿色荧光蛋白 (circularly permuted EGFP, cpEGFP). cpEGFP 与感应元件(如钙调蛋白和 M13 肽等)融合,形成复合探针,感应元件结合目标分子(如 Ca^{2+} 等)后发生构象变化,使 144 与 145 氨基酸残基相互靠近,恢复绿色荧光蛋白原有的构象与荧光特性. 基于这一原理开发的 GCaMP 探针被成功应用于细胞内钙离子浓度检测中^[19-21]. 化学交联剂(如戊二醛)可共价固定蛋白质相互作用界面,已被广泛应用于冷冻电镜的结构研究中,用来稳定瞬态复合物,实验中需对反应浓度和时间进行优化,以避免过度交联导致的蛋白聚集或构象失真.

本研究设计开发了分子探针 pParkin-cpEGFP-pUb,以 cpEGFP 为信号报告单元,将拟磷酸化突变

的 Parkin^{S65D} (pParkin) 与 Ub^{S65D} (pUb) 作为分子识别单元,激活态的 PINK1 可与 pParkin、pUb 发生相互作用促使 cpEGFP 构象转变并恢复荧光信号,通过荧光强度的变化可实时检测复合物的形成(图 2). 同时通过大量实验筛选,获得了高激酶活性的突变体 TcPINK1^{L552R} (135-570). 研究者分别构建 Parkin^{S65D}-cpEGFP-Ub^{S65D} 与 TcPINK1^{L552R} (135-570) 的原核表达载体,经过亲和层析、凝胶过滤层析得到高纯度蛋白. 将共同孵育的蛋白经过凝胶过滤层析色谱分离,获得了构象均一的复合物. 经戊二醛交联固定后,负染电子显微技术清晰显示样品中蛋白颗粒呈现均一形态分布.

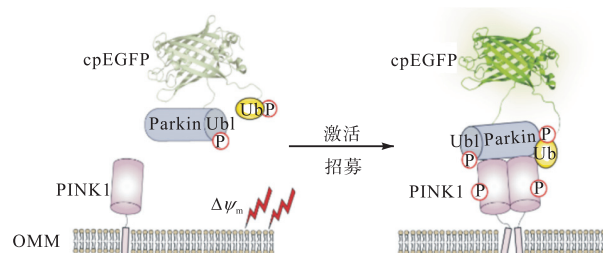


图 2 设计原理

Fig.2 Schematic of design

本研究利用 PINK1 的生物学功能,巧妙设计并利用荧光探针 pParkin-cpEGFP-pUb 进行了复合物的制备及负染电镜的观察. 本研究首次高效制备了 TcPINK1^{L552R} (135-570)、Parkin-Ub 的复合物,为解析 PINK1 招募活化 Parkin 的分子机制提供了有效研究工具和途径,研究方法也可为其他动态蛋白复合物的结构研究提供新思路.

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌株与质粒:感受态细胞 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* Rosetta (DE3) 购自全式金生物公司;原核表达载体 pET.3C、pET15b 为实验室前期留存.

基因: *Parkin*、*cpEGFP* (序列重排)、*Ub*、*TcPINK1* (135-570 截短体) 为实验室前期留存.

试剂:超保真 DNA 聚合酶 (Vazyme)、甲基化模板消化酶 dNTP (Vazyme)、同源重组酶 (TransGen)、质粒小提试剂盒 (TIANGEN)、Ni-NTA 树脂 (GE Healthcare)、MBP 亲和介质 (GE Healthcare)、Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare)、Superose 6 300/10 GL (GE Healthcare)、Anti-MBP

(Proteintech)、Anti-HIS (Proteintech)、戊二醛(光复精细化工研究所)。

仪器: PCR 扩增仪(Eppendorf)、琼脂糖凝胶电泳仪(Bio-Rad)、蛋白质凝胶电泳仪(Bio-Rad)、菌液培养摇床(Thermo Fisher Scientific)、凝胶成像仪(Eppendorf)、ÄKTA pure(GE Healthcare)。

1.2 实验方法

1.2.1 目的蛋白表达质粒的构建、引物合成和 DNA 序列测定

探针 pParkin-cpEGFP-pUb 原核表达载体的构建: 通过点突变聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)将实验室保存质粒 pET.3C-MBP-Parkin-cpEGFP-Ub 突变产生 pET.3C-MBP-pParkin-cpEGFP-pUb。使用超保真 DNA 聚合酶、引物 Parkin-S65D-F、Parkin-S65D-R 扩增含目的基因的载体 pET.3C-MBP-Parkin-cpEGFP-Ub, 退火温度为 55 °C, 延伸时间 6 min, 扩增 30 个循环。扩增结束后, 利用 DpnI 酶消化模板, 产物转化至 *E.coli* DH5 α 感受态细胞中, 氨苄西林抗性 Luria-Bertani 固体培养基(LB 平板)过夜培养, 挑取单克隆菌落, 并提取质粒测序验证。验证成功后继续使用超保真 DNA 聚合酶、引物 Ub-S65D-F、Ub-S65D-R 扩增含目的基因的载体 pET.3C-MBP-pParkin-cpEGFP-Ub, 退火温度为 55 °C, 延伸时间 6 min, 扩增 30 个循环。扩增结束后, 利用 DpnI 酶消化模板, 产物转化至 *E.coli* DH5 α 感受态细胞中, 氨苄西林抗性 LB 平板过夜培养, 挑取单克隆菌落, 并提取质粒测序验证。

TcPINK1 (135-570) 原核表达载体构建: 以 pET15b 为载体, 插入目的基因片段 *TcPINK1* (135-570), 通过 PCR 联合同源重组技术构建质粒 pET15b-*TcPINK1* (135-570)。使用超保真 DNA 聚合酶, 在引物 pET15b-F、pET15b-R 和 *TcPINK1*-F、*TcPINK1*-R 下扩增载体和目的基因, 退火温度为 55 °C, 延伸时间分别为 5 min 和 1 min, 扩增 30 个循环。扩增结束后, 利用 DpnI 酶消化模板, 利用同源重组酶连接载体和目的基因, 产物转化至 *E.coli* DH5 α 感受态细胞中, 氨苄西林抗性 LB 平板过夜培养, 挑取单克隆菌落, 并提取质粒测序验证。

TcPINK1^{L552R} (135-570) 原核表达载体构建: 以 pET15b-*TcPINK1* (135-570) 为模板, 通过定点突变引入 L552R。使用超保真 DNA 聚合酶、引物 *TcPINK1*-L552R-F、*TcPINK1*-L552R-R 扩增含目的基因的载体 *TcPINK1* (135-570), 退火温度为 55 °C, 延伸时间 6 min, 扩增 30 个循环。扩增结束后, 利用 DpnI 酶消

化模板, 产物转化至 *E.coli* DH5 α 感受态细胞中, 氨苄西林抗性 LB 平板过夜培养, 挑取单克隆菌落, 并提取质粒测序验证。

上述实验均通过 Primer Premier 6.0 设计引物(表 1), 由擎科生物合成引物, 采用 Sanger 测序(金唯智公司)验证克隆位点, 使用 Snapgene 进行序列比对。本研究中所用质粒均经测序鉴定正确。

表 1 PCR 引物序列

Tab.1 PCR primer sequences

引物名称	序列(5'→3')
Parkin-S65D-F	CAGCAGGACATTGTTACATTGTG-CAGAG
Parkin-S65D-R	GAACAATGTCCTGCTGATCCAGG-TCACAATTC
Ub-S65D-F	CTACAACATCCAGAAAGAGGACG-TAAACC
Ub-S65D-R	CACCAGGTGGTTTACGTCCTCTTTC
pET15b-F	CTTCCCGAAGCTTGATTAAGCTCGAG-GGCTGCTAACAAAGC
pET15b-R	TTTTCGAGATGGCTTCGGATCCGC-CACCTGGAAG
<i>TcPINK1</i> -F	CCAGGTTGGCGGATCCGAAGCCA-TCTCGAAAATCAAATGGC
<i>TcPINK1</i> -R	AGCAGCCCTCGAGTTAATCAAGT-TCGGGAAGATTTTCTGAATC
<i>TcPINK1</i> -L552R-F	TTGTGTAGAGCTAAGCGTGCAAA-TGTTAGAAATG
<i>TcPINK1</i> -L552R-R	CTAACATTTGCACGCTTAGCTCTA-CACAAAAAAC

1.2.2 探针 pParkin-cpEGFP-pUb 的小量表达鉴定

将测序验证正确的质粒 pParkin-cpEGFP-pUb 转化至 *E.coli* Rosetta (DE3) 感受态细胞中, 氨苄西林抗性 LB 平板过夜培养, 挑取单克隆菌株至含 100 μ g/mL 氨苄西林的 LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养至 OD₆₀₀ 取值为 0.6 ~ 0.8 时, 加入终浓度 0.2 mmol/L IPTG、0.4 mmol/L ZnCl₂, 于 16 °C、220 r/min 诱导表达 18 h, 5 000g 离心 20 min 收集菌液, 高压破碎菌体, 36 000g 离心 50 min 收集上清中的可溶性蛋白, 通过 10% SDS-PAGE 检测目的蛋白表达量。

1.2.3 目的蛋白在大肠杆菌中的大量表达及纯化

探针 pParkin-cpEGFP-pUb 的表达及纯化: 探针目的蛋白 N 端带有 MBP 标签, 选用 MBP 介质对收集到的可溶蛋白进行亲和层析纯化。基于 MBP 介质与麦芽糖间的高亲和力, 使用不含麦芽糖的洗杂缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 300 mmol/L NaCl, 5% 甘油), 清洗 30 ~ 40 个柱体积 (column volume, CV) 以去除非特异性吸附的蛋白质。洗脱目标蛋白时, 用洗脱缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),

200 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 麦芽糖, 5% 甘油, 10 mmol/L DTT)洗脱 0.5 CV, 共执行 8 轮. 洗脱样品利用 10% SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的纯度. 随后收集浓缩纯度较高的样品, 用 Superose 6 300/10 Increase GL 进行凝胶过滤层析. 分子筛缓冲液成分为 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5), 200 mmol/L NaCl, 10 mmol/L DTT.

TcPINK1 (135-570) 的表达及纯化: 将测序验证正确的质粒转化至 *E.coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中, 蛋白的大量表达、菌体破碎、蛋白上清的收集步骤与探针的过程一致, 其中蛋白的诱导条件为终浓度 0.4 mmol/L IPTG. 由于 *TcPINK1* (135-570) 蛋白 N 端带有 6 个连续的 His 标签, 选用 Ni-NTA 介质进行亲和层析纯化, 使用低咪唑的洗杂缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5), 40 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, 10% 甘油) 清洗 30 ~ 40 CV, 用洗脱缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5), 300 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, 10% 甘油) 洗脱 0.5 CV, 共执行 8 轮. 随后, 选用 Superdex 200 Increase 10/300 GL 进行凝胶过滤层析. 分子筛缓冲液成分为 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5), 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT. *TcPINK1*^{L552R} (135-570) 纯化方式与野生型蛋白一致.

为保持蛋白活性, 避免降解, 纯化操作均在 4 ~ 10 °C 条件下进行. 纯化后的目的蛋白液氮速冻后存放于 -80 °C 冰箱中备用.

1.2.4 *TcPINK1* (135-570) 的体外激酶活性检测

为验证在原核系统中表达、纯化的 *TcPINK1* 是否折叠正确, 研究者利用本实验室建立的方法对 *TcPINK1* 磷酸化 Ub 的激酶活性进行了检测.

本研究使用 APExBIO 公司的 Phos-tag 试剂盒配制 12% Phos-tag SDS-PAGE 凝胶, 将标记有 FITC 的底物 Ub-FITC 荧光蛋白与待检测的 *TcPINK1* 蛋白反应, 具体反应体系见表 2. 上述体系用双蒸水补足至 20 μ L, 混匀后于 30 °C 金属浴反应 5 min, 加入 5 μ L 5 \times SDS loading buffer 终止反应, 最后利用 Phos-tag 凝胶电泳分离, 使用凝胶成像仪 F-535 Y2 进行荧光

表 2 *TcPINK1* 对 Ub-FITC 的激酶反应体系

Tab.2 Reaction system of *TcPINK1* kinase against Ub-FITC

组成成分	终浓度
Tris-HCl (pH 7.5)	50 mmol/L
DTT	1 mmol/L
MgCl ₂	1 mmol/L
ATP	1 mmol/L
Triton X-100	0.1%
<i>TcPINK1</i> 样品	0.3 μ mol/L
FITC-Ub	14 μ mol/L

拍照后, 利用 ImageJ 软件对结果进行定量分析. 所有实验均进行了 3 次重复, 并对实验结果进行统计分析.

1.2.5 探针对 *TcPINK1* (135-570) 的荧光响应检测

研究者对探针进行了表征, 检测了其对于 *TcPINK1* 蛋白的响应. 对探针进行发射光谱扫描, 固定激发光波长为 480 nm, 检测探针在 500 ~ 700 nm 处的发射光谱; 固定发射光波长 520 nm, 检测探针在 400 ~ 516 nm 处的激发光谱.

探针对 *TcPINK1* (135-570) 响应的检测体系如表 3 所示, 上述体系用双蒸水补足至 50 μ L, 反应在 96 孔酶标板中进行, 于微孔板恒温振荡器, 25 °C、300 r/min 反应不同时间梯度, 反应结束后立即用酶标仪检测荧光强度. 进行 3 次重复实验后, 对实验数据进行统计分析.

表 3 探针对 *TcPINK1* 蛋白反应体系

Tab.3 Reaction system of the probe and *TcPINK1*

组成成分	终浓度
Tris-HCl (pH 7.5)	50 mmol/L
DTT	10 mmol/L
Triton X-100	0.1%
NaCl	150 mmol/L
ATP	2 mmol/L
MgCl ₂	10 mmol/L
探针	1 μ mol/L
<i>TcPINK1</i>	50 μ mol/L

1.2.6 复合物的制备

将纯化的蛋白 *TcPINK1*^{L552R} (135-570) 与 pParkin-cpEGFP-pUb 按 2 : 1 摩尔比混合, 4 °C 孵育 60 min 后, 将混合物上样至 Superose 6 300/10 Increase GL 分子筛分离分析. 孵育及洗脱缓冲液成分为 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5), 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 2 mmol/L ATP, 10 mmol/L MgCl₂.

1.2.7 复合物组分分析

将复合物洗脱峰对应的样品进行 SDS-PAGE 电泳, 利用考马斯亮蓝染色和 Western-blot 免疫荧光实验对复合物组分进行分析. *TcPINK1*^{L552R} (135-570) 的分子量理论值为 51.1 kDa, N 端融合表达了 His 标签, 利用 His 特异性抗体进行分析; MBP-Parkin^{S65D}-cpEGFP-Ub^{S65D} 分子量理论值为 131.4 kDa, N 端融合表达了 MBP 标签, 利用 MBP 特异性抗体进行分析.

1.2.8 负染样品的制备、数据收集与分析

通过负染电镜确定样品中复合物蛋白的均一性: 在室温环境下, 在样品中加入 0.075% 戊二醛于 4 °C 孵育 10 min 后, 利用凝胶层析色谱分离获得复合物

样品. 使用辉光放电仪对 300 目碳膜载网进行亲水化处理 30 s, 增强样品吸附性. 取 3 μ L (0.05 mg/mL) 蛋白样品滴加至载网表面, 静置吸附 60 s 后, 用滤纸以轻触方式从载网边缘吸去多余液体. 滴加 5 μ L 2% 醋酸铀染液覆盖载网, 静置 30 s, 用滤纸吸去多余染液, 立即用超纯水轻轻冲洗载网 3 次, 自然晾干.

使用配备 Gatan Orius SC1000 探测器(赛默飞世尔科技公司)的 Talos L120 CG2 透射电镜(120 kV)采集数据, 选择颗粒分散性较好、染色均匀的区域进行数据收集. 使用 ImageJ 软件 Analyse Particles 程序计算颗粒直径大小并做图分析.

2 结果

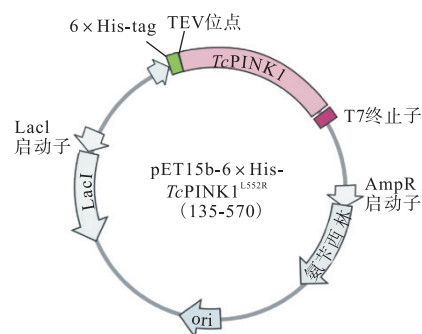
2.1 质粒的设计与构建

探针 pParkin-cpEGFP-pUb 原核表达载体的构建: 利用 cpEGFP 的特性, 在其 N 端连接 Parkin, C 端连接 Ub 分子, 通过 PINK1 与 Parkin、Ub 的相互作用, 拉近并限制 cpEGFP 循环排列的 N 端、C 端的距离, 实现对 PINK1 不同浓度的荧光表征量化分析. 本研究基于 PINK1/Parkin 及线粒体自噬相关分子机制, 对分子识别单元 Parkin、Ub 进行了拟磷酸化改造, 旨在实现对 TcPINK1 的稳定结合与检测.

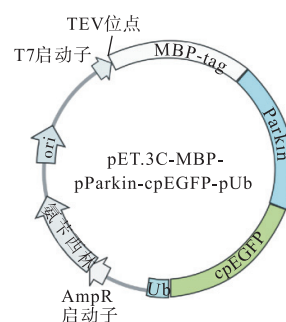
在 PINK1/Parkin 通路中, PINK1 通过磷酸化 Parkin 的 Ser65 位点激活其 E3 泛素连接酶活性. 拟磷酸化突变(如 Parkin 的 S65D 突变)能够模拟磷酸化作用, 使 Parkin 处于预激活状态, 从而更高效地响应 PINK1 信号. 同时, PINK1 磷酸化的泛素(pSer65-Ub)作为 Parkin 的激活剂, 能够更紧密地结合这种拟磷酸化突变的 Parkin, 进一步增强探针对 PINK1 的响应能力. 因此, 本研究在 Parkin 的 Ub1 结构域上、Ub 上分别引入了 S65D 拟磷酸化突变, 以期增强探针与 PINK1 的结合效率, 稳定蛋白间的瞬时相互作用, 助力 PINK1/Parkin-Ub 复合物的获得. 通过点突变 PCR 将含探针的质粒 pET.3C-MBP-Parkin-cpEGFP-pUb 突变为 pET.3C-MBP-pParkin-cpEGFP-pUb, N 端带有 MBP-tag 用于提高探针的可溶性表达及亲和纯化(图 3).

TcPINK1(135-570)原核表达载体的构建: TcPINK1(135-570)截短体为去除 N 端线粒体定位信号序列, 保留激酶结构域和 CTD 结构域, 代表 TcPINK1 在胞质中的构象; L552R 点突变的引入使 TcPINK1 处于激活态构象(本实验室前期研究结果), 理论上更易结合招募 Parkin. 构建质粒 pET15b-TcPINK1(135-570)后, 通过点突变 PCR 引入 L552R 突变, 其中 6 \times His-tag 用于后期目的蛋白的亲和纯化

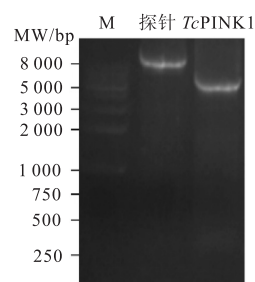
(图 3).



(a) TcPINK1 质粒结构示意图



(b) 探针质粒结构示意图



(c) 琼脂糖凝胶电泳图

图 3 质粒结构与琼脂糖凝胶电泳结果

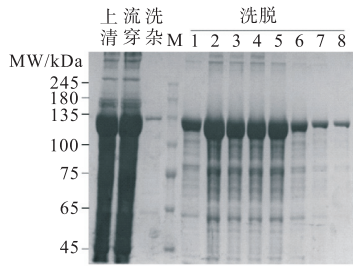
Fig.3 Plasmid structure and agarose gel electrophoresis result

2.2 探针 MBP-pParkin-cpEGFP-pUb 的表达与纯化

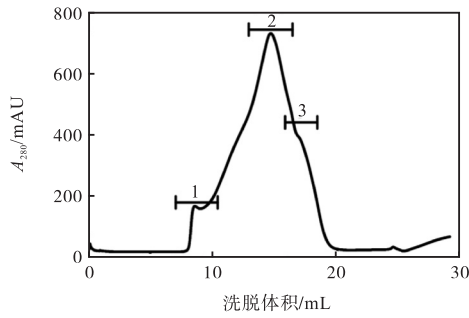
探针的理论分子质量约 131.4 kDa, 经 MBP 亲和层析纯化后, SDS-PAGE 显示纯度约 75% (图 4(a)), 经分子筛进一步纯化后纯度约 90% (图 4(b)). 对照色谱柱分离范围具体分析, 其中 1 号峰可能为目的蛋白高聚体, 2 号峰为目的蛋白, 3 号峰包含了蛋白降解物. 目的蛋白不均一且出现多峰形可能是由于融合了 4 个蛋白(MBP-tag、pParkin、cpEGFP、pUb)的探针构象不均一, 且发生了部分降解. 收集 2 号峰中目的蛋白进行后续实验.

2.3 TcPINK1(135-570)蛋白的表达与纯化

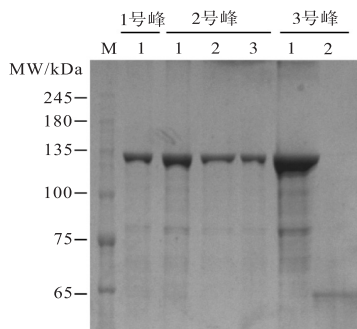
TcPINK1(135-570)的理论分子质量约 51.5 kDa, 镍柱亲和层析初步纯化后, SDS-PAGE 显示纯度约



(a) MBP 亲和层析结果图



(b) 探针蛋白的体积排阻色谱



(c) 探针洗脱蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

图 4 MBP-pParkin-cpEGFP-pUb 的表达、纯化结果

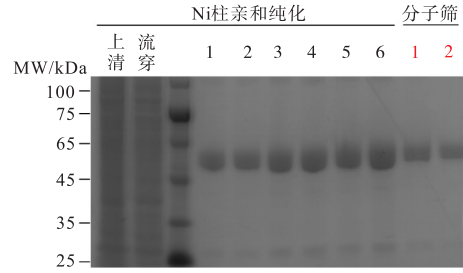
Fig.4 Expression and purification results of MBP-pParkin-cpEGFP-pUb

85%, 经分子筛进一步纯化后纯度达 95% 以上, 每升培养基可获得高纯度蛋白约为 15 mg, 如图 5 所示.

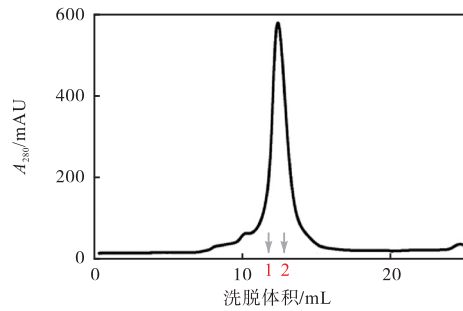
2.4 TcPINK1 (135-570) 与探针相互作用的研究

光谱扫描数据显示, 基于 Parkin-Ub 拟磷酸化突变的探针 pParkin-cpEGFP-pUb 在 1 μmol/L 浓度下有明显的激发、发射光谱, 说明该蛋白经表达、纯化后仍有荧光活性, 具有成为荧光分子探针的潜力(图 6(a)). 探针的最佳激发波长为 498 nm, 发射波长为 513 nm.

如图 6 所示, 探针 pParkin-cpEGFP-pUb 可成功响应 TcPINK1 (135-570), 且探针的荧光强度随着 TcPINK1 (135-570) 蛋白浓度的增加而增强. 该结果说明本研究中设计构建、表达与纯化出的探针 pParkin-cpEGFP-pUb 可有效结合 TcPINK1 蛋白, 为捕获 TcPINK1 与 Parkin-Ub 相互作用的复合物提供



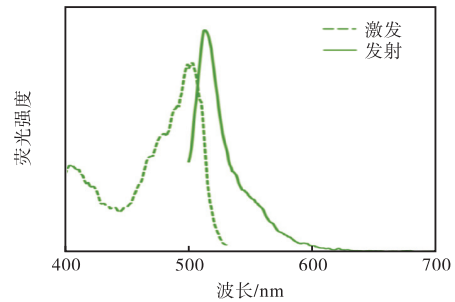
(a) TcPINK1 (135-570) 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图



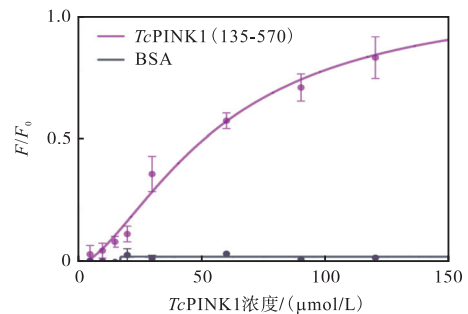
(b) TcPINK1 (135-570) 蛋白的体积排阻色谱

图 5 TcPINK1 (135-570) 的表达、纯化结果

Fig.5 Expression and purification results of TcPINK1 (135-570)



(a) 探针的激发、发射光谱



(b) 探针响应 TcPINK1 的荧光曲线

图 6 TcPINK1 与 pParkin-cpEGFP-pUb 相互作用的荧光数据

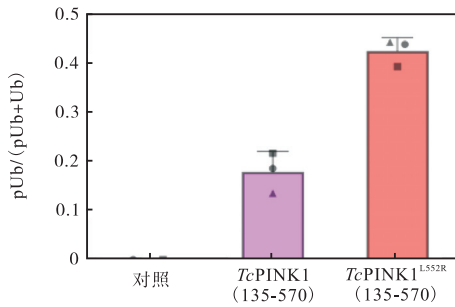
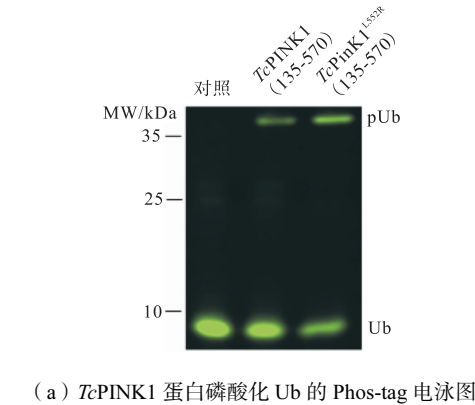
Fig.6 Fluorescence data of the interaction between TcPINK1 and pParkin-cpEGFP-pUb

关键工具.

2.5 TcPINK1 (135-570) 体外激酶活性的检测

激酶活性检测实验显示, 体外纯化的 TcPINK1

(135-570)能够有效磷酸化 Ub, 具有良好催化活性(图 7(a)). 定量分析 pUb 条带的灰度值, 结果显示 *TcPINK1*^{L552R} (135-570) 突变体的激酶活性水平显著高于野生型 *TcPINK1* (135-570) (图 7(b)). 自激活后的 PINK1 可通过磷酸化 Ub, 而后招募活化 Parkin, 因此激活突变体理论上更易与探针中的 Parkin-Ub 单元发生相互作用, 形成稳定的复合物. 因此在后续复合物的组装中, 选择利用这种高活性突变体进行稳定复合物的捕获.



(b) Phos-tag 结果灰度分析 *TcPINK1* 蛋白磷酸化 Ub 的能力

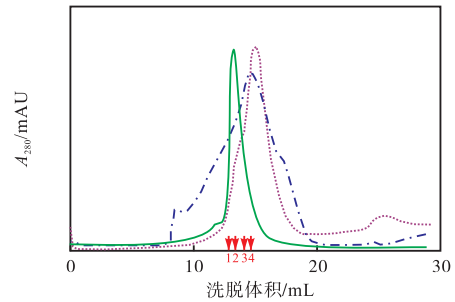
图 7 *TcPINK1* 磷酸化 Ub 的体外激酶活性结果

Fig.7 *In vitro* kinase activity results of *TcPINK1*, which phosphorylates Ub

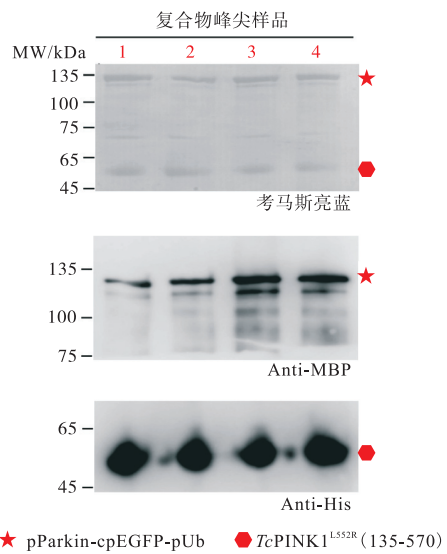
2.6 *TcPINK1*^{L552R} (135-570) 与 Parkin-Ub 复合物的组装

将分别纯化的 *TcPINK1*^{L552R} (135-570) 和 pParkin-cpEGFP-pUb 蛋白进行共孵育后, 利用 Superose 6 300/10 Increase GL 进行凝胶过滤层析分离大分子复合物, 如图 8(a) 所示, 复合物洗脱峰的峰尖位置 (13.3 mL), 较同一分子筛下的单独 *TcPINK1*^{L552R} (135-570) (15.1 mL) 和 pParkin-cpEGFP-pUb (14.9 mL) 洗脱的峰尖位置均明显前移. 如图 8(b) 所示, 考马斯亮蓝染色和 Western blot 结果均显示在洗脱液中同时存在约 51.1 kDa (*TcPINK1*^{L552R} (135-570)) 与 131.4 kDa (pParkin-cpEGFP-pUb) 条带. 复合物峰形单一且锐利, 说明在形成复合物的过程中, 探针及

TcPINK1^{L552R} 发生相互作用, 探针的构象改变且被均一化, 揭示了稳定复合物的成功捕获.



(a) *TcPINK1*^{L552R} (135-570) / pParkin-cpEGFP-pUb 的体积排阻色谱



(b) 复合物洗脱蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

图 8 *TcPINK1*^{L552R} (135-570) / pParkin-cpEGFP-pUb 的分子筛层析结果

Fig.8 Molecular sieve chromatography results of the *TcPINK1*^{L552R} (135-570) / pParkin-cpEGFP-pUb

2.7 负染电镜观察

研究者对样品进行 120 kV 常温透射电镜检测, 并对复合物的样品进行进一步优化, 以满足冷冻电镜实验对蛋白质样品均一性和稳定性的高要求. 利用交联试剂对蛋白质复合物进行稳定是制备复合物样品常用的一种方法. Parkin-Ub 与 *TcPINK1*^{L552R} (135-570) 复合物在样品制备过程中可能会发生解离, 本研究引入交联试剂(戊二醛), 通过戊二醛上的醛基与氨基酸上的氨基间形成的共价键, 稳定 PINK1 与 Parkin-Ub 单元间瞬时的弱相互作用, 优化后的交联条件在共孵育的基础上加入 0.075% 戊二醛于 4 °C 孵育 10 min.

进行化学交联后的样品再次用凝胶过滤层析分离, 选取复合物峰尖处的蛋白制备负染电镜样品. 电

镜观察结果如图 9 所示,蛋白质颗粒大小较为均一,直径集中分布于 15~20 nm,说明 *TcPINK1*^{L552R} (135-570) 与探针形成了较为稳定的复合物。

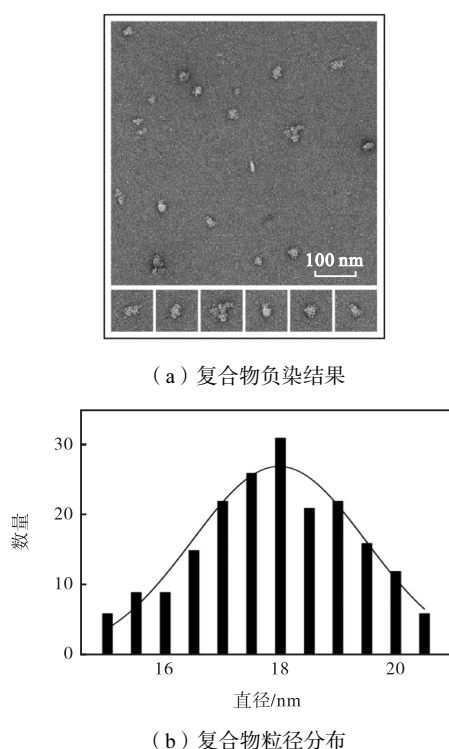


图 9 *TcPINK1*^{L552R} (135-570)/pParkin-cpEGFP-pUb 复合物的负染电镜与粒径分布

Fig.9 Negative staining electron microscopy and particle size distribution of *TcPINK1*^{L552R} (135-570) / pParkin-cpEGFP-pUb complex

3 讨论

本研究通过整合构象敏感型荧光探针、磷酸化模拟突变与化学交联技术,首次实现了 PINK1 与 Parkin-Ub 复合物的制备与结构均一化,为研究这一动态复合物相互作用的分子机制提供了重要工具。

3.1 探针设计的核心优势

相较于传统柔性 Linker, cpEGFP 的引入不仅实现了复合物的稳定组装,其荧光信号可实时反映蛋白质构象变化、量化相互作用强度. cpEGFP 的荧光强度变化直接关联 Parkin-Ub 单元的构象重排,提示探针结合 PINK1 后从开放态向闭合态的转变(图 2). 这一特性使得研究者能够动态监测复合物的形成效率与稳定性,而单纯依赖柔性 Linker 的连接仅能固定空间距离,无法提供构象变化的实时反馈. 此外, cpEGFP 的刚性结构减少了探针自身构象异质性,有助于提高复合物的组装效率,该设计为解决动

态复合物的捕获难题提供了新思路。

3.2 复合物稳定性的设计与验证

Ub 及 Ubl 模拟磷酸化突变(S65D)促进 Parkin 的构象改变,增强 Parkin-Ub 与 PINK1 的结合^[22-25],模拟磷酸化突变的设计增加了复合物的稳定性,为捕捉其功能构象提供了窗口^[5,26]. 利用凝胶色谱层析对单独的 pParkin-cpEGFP-pUb 探针进行分离分析,洗脱峰宽,且存在高聚状态,说明其构象不均一. 与 *TcPINK1*^{L552R} (135-570) 孵育后,复合物的洗脱峰位置较两种单独蛋白组分显著提前(图 8),表明其分子量明显大于单一组分. 此外,洗脱峰峰形尖锐且单一,进一步证实二者通过特异性相互作用驱动探针构象变化,最终形成了均一且结构稳定的复合物。

化学交联可在维持蛋白质天然构象的同时有效抑制复合物解离. 本研究使用化学交联的方法,进一步增强稳定了复合物中各组分的相互作用,实现优势构象的捕获^[27-30]. 通过优化交联条件,最终选用 0.075% 戊二醛交联 10 min.

负染色电镜观测的颗粒形态学参数可直观反映复合物的结构及质量. 交联后样品的负染电镜图像显示复合物颗粒均一(直径 15~20 nm, 图 9(b)),为后续进行冷冻电镜数据收集提供了依据。

3.3 未来研究方向

后续可优化实验条件,进行冷冻电镜样品制备及数据收集,解析高分辨率结构,精准分析 PINK1 与 Parkin-Ub 的相互作用界面,阐明 PINK1 招募活化 Parkin 的关键分子机制。

在本研究中负染电镜颗粒构象较为均一,探针中 MBP 标签与 cpEGFP 的引入未显著干扰复合物的形成. 同时复合物的异质性与其功能执行过程中构象的动态变化密切相关. 负染电镜样品中捕捉的大部分颗粒表征了 PINK1 结合并完全激活 Parkin 后形成的能量最低的稳定复合物构象;少量颗粒可能代表了 PINK1 与 Parkin-Ub 的初始结合构象,还有少数呈高聚状态(图 9(a)). 这种构象分布的差异性可在后续冷冻电镜高分辨率结构解析中进行连续构象分析,为复合物的动态变化提供关键信息。

4 结语

本研究成功构建并纯化了 *TcPINK1*^{L552R} (135-570) 与 Parkin-Ub 的复合物. 通过联合应用 cpEGFP 荧光探针、S65D 磷酸化模拟突变与共价交联技术,建立了动态复合物捕获的有效范式,显著提升了复合

物的稳定性和均一性. 未来结合高分辨率冷冻电镜与人工智能驱动的结构预测, 有望进一步揭示 PINK1/Parkin 通路的分子细节, 并为其他瞬时相互作用体系的研究提供方法论参考.

参考文献:

- [1] GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990—2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. *The Lancet Neurology*, 2019, 18(5): 459-480.
- [2] Poewe W, Seppi K, Tanner C M, et al. Parkinson disease[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2017, 3(1): 17013.
- [3] Surmeier D J, Obeso J A, Halliday G M. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2017, 18(2): 101-113.
- [4] Burbulla L F, Song P, Mazzulli J R, et al. Dopamine oxidation mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease[J]. *Science*, 2017, 357(6357): 1255-1261.
- [5] Pickrell A M, Youle R J. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease[J]. *Neuron*, 2015, 85(2): 257-273.
- [6] Narendra D, Tanaka A, Suen D F, et al. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy[J]. *Journal of Cell Biology*, 2008, 183(5): 795-803.
- [7] Matsuda N, Sato S, Shiba K, et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy[J]. *Journal of Cell Biology*, 2010, 189(2): 211-221.
- [8] Ordureau A, Sarraf S A, Duda D M, et al. Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis [J]. *Molecular Cell*, 2014, 56(3): 360-375.
- [9] Kondapalli C, Kazlauskaitė A, Zhang N, et al. PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65[J]. *Open Biology*, 2012, 2(5): 120080.
- [10] Kazlauskaitė A, Kondapalli C, Gourlay R, et al. Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65[J]. *Biochemical Journal*, 2014, 460(1): 127-139.
- [11] Wauer T, Swatek K N, Wagstaff J L, et al. Ubiquitin Ser65 phosphorylation affects ubiquitin structure, chain assembly and hydrolysis[J]. *The EMBO Journal*, 2015, 34(3): 307-325.
- [12] Lazarou M, Sliter D A, Kane L A, et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy[J]. *Nature*, 2015, 524(7565): 309-314.
- [13] Condos T E, Dunkerley K M, Freeman E A, et al. Synergistic recruitment of UbcH7~Ub and phosphorylated Ubl domain triggers parkin activation[J]. *The EMBO Journal*, 2018, 37(23): e100014.
- [14] Gladkova C, Maslen S L, Skehel J M, et al. Mechanism of parkin activation by PINK1[J]. *Nature*, 2018, 559(7714): 410-414.
- [15] Kumar A, Tamjar J, Waddell A D, et al. Structure of PINK1 and mechanisms of Parkinson's disease-associated mutations[J]. *Elife*, 2017, 6: e29985.
- [16] Schubert A F, Gladkova C, Pardon E, et al. Structure of PINK1 in complex with its substrate ubiquitin[J]. *Nature*, 2017, 552(7683): 51-56.
- [17] Schapira A H, Olanow C W, Greenamyre J T, et al. Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: Future therapeutic perspective [J]. *The Lancet*, 2014, 384(9942): 545-555.
- [18] Akerboom J, Chen T W, Wardill T J, et al. Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging[J]. *Journal of Neuroscience*, 2012, 32(40): 13819-13840.
- [19] Chi X M, Fan Q X, Zhang Y Y, et al. Structural mechanism of phospholipids translocation by MlaFEDB complex[J]. *Cell Research*, 2020, 30(12): 1127-1135.
- [20] Miyawaki A, Llopis J, Heim R, et al. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin[J]. *Nature*, 1997, 388: 882-887.
- [21] Zhang Y, Rózsa M, Liang Y J, et al. Fast and sensi-

- tive GCaMP calcium indicators for imaging neural populations[J]. *Nature*, 2023, 615(7954): 884-891.
- [22] McWilliams T G, Barini E, Pohjolan-Pirhonen R, et al. Phosphorylation of Parkin at serine 65 is essential for its activation *in vivo*[J]. *Open Biology*, 2018, 8(11): 180108.
- [23] Ordureau A, Heo J M, Duda D M, et al. Defining roles of PARKIN and ubiquitin phosphorylation by PINK1 in mitochondrial quality control using a ubiquitin replacement strategy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(21): 6637-6642.
- [24] Leitner A, Joachimiak L A, Unverdorben P, et al. Chemical cross-linking/mass spectrometry targeting acidic residues in proteins and protein complexes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(26): 9455-9460.
- [25] Bingol B, Tea J S, Phu L, et al. The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy[J]. *Nature*, 2014, 510(7505): 370-375.
- [26] Heo J M, Ordureau A, Swarup S, et al. RAB7A phosphorylation by TBK1 promotes mitophagy via the PINK-PARKIN pathway[J]. *Science Advances*, 2018, 4(11): eaav0443.
- [27] Dong D, Zheng L Q, Lin J Q, et al. Structural basis of assembly of the human T cell receptor-CD3 complex[J]. *Nature*, 2019, 573(7775): 546-552.
- [28] Ejike J, Sadoine M, Shen Y, et al. A monochromatically excitable green-red dual-fluorophore fusion incorporating a new large stokes shift fluorescent protein[J]. *Biochemistry*, 2024, 63(1): 171-180.
- [29] Woldemariam S, Nagpal J, Hill T, et al. Using a robust and sensitive GFP-based cGMP sensor for real-time imaging in intact *Caenorhabditis elegans*[J]. *Genetics*, 2019, 213(1): 59-77.
- [30] Brown C, Ghosh S, McAllister R, et al. A proteome-wide quantitative platform for nanoscale spatially resolved extraction of membrane proteins into native nanodiscs[J]. *Nature Methods*, 2025, 22(2): 412-421.

(责任编辑: 田 军)