

DOI:10.11784/tdxbz202502011

## TcPINK1 蛋白的表达、纯化及活性检测

秦晓红, 薛俊蓉

(天津大学生命科学学院, 天津 300072)

**摘要:** PINK1 是一种定位在线粒体外膜上的丝氨酸/苏氨酸激酶, 可感受线粒体损伤, 通过招募 PARKIN 启动线粒体自噬, 其功能性突变与家族性帕金森氏症(PD)密切相关. 为探索 PINK1 家族蛋白 N 端对激酶催化功能的影响, 本研究将赤拟谷盗 PINK1 (*TcPINK1*) 3 种不同长度 N 端截短体的基因克隆至 pET15b 表达载体, 然后转化至大肠埃希氏菌 BL21 (DE3) 中, 并对诱导剂 IPTG 的浓度、诱导温度等进行优化. 目标蛋白经 Ni-NTA 亲和层析、阴离子交换层析和分子筛纯化后, 利用 FITC 标记的泛素作为底物进行激酶活性检测. 实验显示, 在 OD<sub>600</sub> 值为 0.6~0.8、表达温度为 16 °C、IPTG 浓度为 0.4 mmol/L、诱导表达 18 h 时, *TcPINK1* 不同截短体蛋白可溶性表达量均较高, 并显示出磷酸化泛素的活性. 分子排阻色谱和酶活性检测结果显示, *TcPINK1* 的 N 端  $\alpha$ A 螺旋对激酶的聚集状态及活性具有调节作用. *TcPINK1* 和人源 PINK1 (*hPINK1*) 的序列和结构对比均显示激酶区具有较高同源性, 对 *TcPINK1* 酶活性调节机制的研究与探究可为 PINK1 蛋白家族的生物学功能提供重要信息.

**关键词:** 帕金森氏症; *TcPINK1*; AlphaFold 3; 原核表达

中图分类号: R742.5

文献标志码: A

文章编号: 0493-2137(2026)02-0203-09

## Expression, Purification, and Activity Determination of *TcPINK1*

Qin Xiaohong, Xue Junrong

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

**Abstract:** PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) is a serine/threonine kinase located on the outer membrane of mitochondria. It detects mitochondrial damage and initiates mitochondrial autophagy by recruiting the PARKIN protein. Its functional mutation is closely related to familial Parkinson's disease (PD). To explore the influence of the N-terminal of PINK1 family proteins on the catalytic function of kinases, three N-terminal truncated genes of *Tribolium castaneum* PINK1 (*TcPINK1*) with different lengths were cloned into the pET15b expression vector and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The concentration of the inducer IPTG and induction temperature were optimized. The target protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography, anion exchange chromatography, and molecular sieve chromatography, and FITC-labeled ubiquitin was used as the substrate for kinase activity detection. The findings indicated that the soluble expression levels of various truncated *TcPINK1* proteins were consistently high under the conditions of 0.4 mmol/L IPTG, an induction period of 18 h, OD<sub>600</sub> values of 0.6—0.8, and a temperature of 16 °C. All variants exhibited phosphorylation activity toward ubiquitin. In addition, results from molecular sieving combined with enzyme activity assays demonstrated that the N- $\alpha$ A helix of *TcPINK1* played a regulatory role in the aggregation state and enzymatic activity of the kinase. Comparative analyses of the sequence and structure of *TcPINK1* and *human* PINK1 (*hPINK1*) demonstrated a high degree of homology within the kinase domain. This study of the regulatory mechanism of *TcPINK1* enzymatic activity provides important information for exploring the biological function of the PINK1 protein family.

**Keywords:** Parkinson's disease (PD); *Tribolium castaneum* PINK1; AlphaFold 3; prokaryotic expression

收稿日期: 2025-02-14; 修回日期: 2025-03-24.

作者简介: 秦晓红 (1984—), 女, 博士, 副教授, qinxiaohong@tju.edu.cn.

通信作者: 薛俊蓉, xjr\_science@tju.edu.cn.

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (21JCQNJC01660).

Supported by the Natural Science Foundation of Tianjin, China (No. 21JCQNJC01660).

帕金森氏症(Parkinson's disease, PD)是一种神经退行性疾病,患者中脑黑质致密部的多巴胺能神经元变性死亡<sup>[1-2]</sup>,研究显示线粒体功能障碍与帕金森氏症密切相关<sup>[3-5]</sup>.作为细胞能源工厂,线粒体稳态的精细调控对细胞生存至关重要.线粒体自噬是调控其稳态的重要途径<sup>[6]</sup>.一旦线粒体受损、衰老或丧失正常功能,其会启动自噬机制,及时清除受损线粒体,保护神经元.PINK1(PTEN-induced putative kinase 1)/PARKIN(E3 ubiquitin-protein ligase)是启动线粒体自噬的关键途径,该通路失调会导致受损线粒体堆积,神经元凋亡,进而引发包括帕金森氏症在内的神经退行性疾病<sup>[7-8]</sup>.

PINK1(EC:2.7.11.1)定位在线粒体外膜上,可磷酸化泛素第65位的丝氨酸,是线粒体损伤的主要探测器<sup>[9]</sup>.人源PINK1(*human* PINK1, *hPINK1*)由581个氨基酸组成,PINK1蛋白的N端存在线粒体定位信号及内膜转移信号,中间为丝氨酸/苏氨酸激酶结构域以及独特的C末端结构域(C-terminal domain, CTD),推测参与激酶活性调节和线粒体外膜滞留<sup>[10-11]</sup>.在正常的线粒体中,*hPINK1*前体会被线粒体加工肽酶(mitochondrial processing peptidase, MPP)和早老素相关菱形蛋白(presenilin-associated rhomboid like, PARL)以及线粒体膜AAA蛋白酶和ATP依赖性蛋白酶切割,形成相对稳定的52 kDa和41 kDa成熟形式,或更短的水解产物,在细胞质中被蛋白酶体识别降解,因而生理条件下*hPINK1*蛋白的水平很低,难以检测到<sup>[12-13]</sup>.当线粒体损伤或膜电位异常时,PINK1聚集活化,磷酸化泛素(ubiquitin, Ub)链及PARKIN泛素样结构域上的S65<sup>[14]</sup>.PARKIN具有E3泛素连接酶活性,以PINK1依赖性方式被活化,随后泛素化线粒体外膜蛋白,介导形成围绕受损线粒体的隔离膜,之后通过自噬途径清除整个被标记的细胞器<sup>[12,15-16]</sup>.*PINK1*基因敲除小鼠呈现连续性的神经退行性病变<sup>[17-20]</sup>.

Woodroof等<sup>[21]</sup>研究显示,带MBP(maltose binding protein)标签的*hPINK1*在大肠杆菌及SF9细胞中外源表达的纯化产物,几乎没有可检测的激酶活性.而含融合标签MBP的重组*TcPINK1*、*PhPINK1*(*P. humanus corporis*)和*dPINK1*(*D. melanogaster*)在大肠杆菌中表达纯化后,酶活性比较显示*TcPINK1*的激酶活性最高,*PhPINK1*次之.随后不少科研团队通过研究*TcPINK1*和*PhPINK1*的结构与功能,揭示了PINK1蛋白家族对Ub和PARKIN磷酸化的分子机制,并利用相应的*hPINK1*突变体在细胞内进行功

能验证,显示该蛋白家族具有相似的底物识别及激酶催化机制<sup>[22-25]</sup>.

PINK1为线粒体外膜蛋白,N端存在线粒体定位信号,在细胞内会被MPP和PARL等酶连续切割,水解为不同长度的截短体,这些截短体不只是中间降解产物,可能具有生物学功能<sup>[12,26]</sup>.为研究N端对激酶活性的影响,本研究设计了*TcPINK1*(a.a.100-570)、*TcPINK1*(a.a.117-570)和*TcPINK1*(a.a.135-570)3种截短体,分别代表了截掉线粒体定位肽、模拟PARL等酶切割后相对稳定的片段(对应*hPINK1*水解的52 kDa和41 kDa片段).将其在大肠杆菌工程菌中外源表达,经过Ni-NTA亲和层析、阴离子交换层析及分子筛纯化后,纯度均大于95%.利用纯化后的*TcPINK1*蛋白作为激酶、FITC标记的泛素作为底物,Phos-tag SDS-PAGE电泳结果显示*TcPINK1*的N端对激酶活性具有显著影响.本研究为深入探索PINK1家族的酶活性调节提供了有效途径.*TcPINK1*(a.a.100-570)、*TcPINK1*(a.a.117-570)和*TcPINK1*(a.a.135-570)下文中简称为*TcPINK1*<sup>100-570</sup>、*TcPINK1*<sup>117-570</sup>和*TcPINK1*<sup>135-570</sup>.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

将实验室存有编码全长*TcPINK1*基因的pET-15b载体,基因扩增用菌株*E. coli* Trans1(T1)感受态购自北京全式金生物技术有限公司;表达菌株*E. coli* BL21(DE3)为实验室保存. Phanta Max超保真DNA聚合酶,购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;甲基化模板消化酶(DpnI),购自NEB公司;质粒提取试剂盒,购自北京天根生化科技有限公司;胰蛋白酶、酵母提取物、NaCl,购自上海生工生物工程有限公司;Ni-NTA亲和层析柱、阴离子交换柱、Superdex 200分子筛、AKTA纯化仪,购自美国GE公司. AlphaFold 3为开源网址(<https://alphafoldserver.com>).

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 *TcPINK1*与*hPINK1*蛋白序列比对

利用ClustalX软件对*TcPINK1*与*hPINK1*蛋白序列进行比对,并利用ESPrpt 3.0在线软件(<http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>)进行做图分析,以*TcPINK1*蛋白(PDB ID: 7MP9)的二级结构作为参考.序列比对的蛋白分别来自物种人源(*Homo sapiens*)和赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*).

### 1.2.2 基于 AlphaFold 3 的 *hPINK1* 结构预测

在 uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 中下载相关蛋白的序列: *hPINK1* (Uniprot ID: Q9BXM7). 打开 AlphaFold 3 网址 (<https://alphafoldserver.com/>): 第 1 个数据框输入 *hPINK1* 的蛋白序列, “entity type” 选择 “protein”, “copies” 选择 “1”; 添加数据框之后, “entity type” 选择 “lon”, “copies” 选择 “1”, 之后下拉数据框选择 “Mg<sup>2+</sup>”; 再添加数据框之后, “entity type” 选择 “Ligand”, “copies” 选择 “1”, 之后下拉数据框选择 “ATP”; 最后点击运行.

### 1.2.3 pET15b-*TcPINK1* 原核表达质粒的构建

*PINK1* 蛋白 N 端存在线粒体定位信号及单次跨膜螺旋, 在细胞内发挥功能时, N 端会被蛋白酶水解, 形成约 52 kDa 和 41 kDa 大小不同的截短体. *TcPINK1* 蛋白由 570 个氨基酸组成, 与人源蛋白有较高的同源性. 本研究选取 *TcPINK1*<sup>100-570</sup>、*TcPINK1*<sup>117-570</sup> 和 *TcPINK1*<sup>135-570</sup> 3 个不同的截短体, 用 Phanta Max 超保真 DNA 聚合酶扩增含目的基因的载体 pET15b, 所用的引物如表 1 所示, 延伸时间为 7 min, 共扩增 25 个循环. 扩增结束后, 利用 DpnI 酶消化模板, 然后将产物转化到 *E.coli* Trans1 (T1) 感受态细胞中, 过夜培养, 挑取单克隆菌落, 并提取质粒, 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	序列 (5'→3')
<i>TcPINK1</i> <sup>100-570</sup> -F	GGCGACTCCGCCCGTTTTT
<i>TcPINK1</i> <sup>100-570</sup> -R	AAACGGGGCGGAGTCGCCGATCC-GCCACCCTGGAAGT
<i>TcPINK1</i> <sup>117-570</sup> -F	ACCGGAATTTTAACCAAAGAAGAG-GA
<i>TcPINK1</i> <sup>117-570</sup> -R	TTTGGTTAAAATTCCGGTGATCCG-CACCCTGGAAGT
<i>TcPINK1</i> <sup>135-570</sup> -F	GAAGCCATCTCGAAAATCAAATGGC
<i>TcPINK1</i> <sup>135-570</sup> -R	ATTTGATTTTCGAGATGGCTTCGGA-TCCGCCACCCTGGAAG

### 1.2.4 *TcPINK1* 不同截短体蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

将测序正确的质粒转化至 *E.coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中, 挑取单克隆菌落至含 100 μg/mL 氨苄霉素的 5 mL LB 培养液中, 37 °C、220 r/min 摇床培养过夜, 然后将 5 mL 培养液接种于含氨苄霉素的 1 L LB 培养液中, 37 °C、220 r/min 培养至浓度达到 OD<sub>600</sub> 值约为 0.6 ~ 0.8 时, 降温至 16 °C 培养, 并加入 400 μmol/L IPTG 诱导蛋白表达, 18 h 后收集菌体. 菌体在 4 °C、4 000 r/min 离心 5 ~ 10 min, 弃去培养基, 保留菌体沉淀物.

### 1.2.5 *TcPINK1* 不同截短体蛋白的纯化

将冻存的菌体解冻, 加预冷的裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, 10% 甘油, 0.5% Triton X-100) 重悬, 向重悬好的菌液中加入 1 mmol/L PMSF, 混匀后用高压细胞破碎仪进行裂解, 破碎 3 或 4 次至溶液变清. 将裂解后的菌液倒入 50 mL 高速离心管中, 4 °C、18 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液. 将上清液加到平衡好的镍介质中, 在摇床上孵育 1 h (4 °C), 之后加入 BioRed 柱子中, 利用重力作用滴下. 用 60 mL 洗杂缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 500 mmol/L NaCl, 40 mmol/L 咪唑, 10% 甘油) 进行洗涤. 用洗脱缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 500 mmol/L NaCl, 300 mmol/L 咪唑, 10% 甘油) 从柱上将目的蛋白洗脱下来.

AKTA 设置程序, 用脱盐柱 (hitrap desalting) 降低蛋白所在溶液的盐浓度, 脱盐缓冲液组成为 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、20 mmol/L NaCl、5% 甘油, 1 mmol/L DTT (现用现加). 然后用阴离子交换柱 (hitrap Q<sup>TM</sup>) 对蛋白进行纯化, 阴离子交换柱缓冲液组成为: 低盐缓冲液 (A 液) 组成为 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、5% 甘油、1 mmol/L DTT (现用现加); 高盐缓冲液 (B 液) 组成为 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、1 mol/L NaCl、5% 甘油、1 mmol/L DTT (现用现加). 设置 0 ~ 1 mol/L NaCl 连续盐浓度梯度进行目的蛋白的分离洗脱. 最后用凝胶过滤层析柱 (Superdex 200 Increase 10/300 GL) 对蛋白进一步纯化, 分子筛缓冲液组成为 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、100 mmol/L NaCl、1 mmol/L DTT (现用现加).

### 1.2.6 *TcPINK1* 不同截短体激酶活性检测

利用实验室建立的激酶检测方法检测 *PINK1* 的活性. 将终浓度为 0.3 μmol/L *TcPINK1* 蛋白加入激酶反应缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 10 mmol/L DTT, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 20 mmol/L ATP, 0.1% Triton X-100) 中, 于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 吹吸混匀后分别取 24 μL 激酶反应缓冲液加入到预冷的 1.5 mL 离心管中, 加入 16 μL FITC 标记的 Ub, 吹吸混匀后将 40 μL 反应缓冲液于室温, 在掌上离心机离心 30 s, 立即转移至 30 °C 恒温金属浴中. 反应温度为 30 °C, 反应时间为 10 min 和 20 min. 提前向 1.5 mL 离心管中加入 4 μL 含有 β-巯基乙醇的 SDS 上样缓冲液, 等激酶反应时间结束后, 立即取 20 μL 反应样品至上样缓冲液中, 吹吸混匀, 使激酶反应终止. 最后利用 Phos-tag SDS-PAGE 电泳, 对胶进行荧光拍照后, 利用 ImageJ 软件对结果进行定量分析.

## 2 结果

### 2.1 *Tc*PINK1 与 *h*PINK1 的序列对比结果

本研究利用 ClustalX 软件对 *Tc*PINK1 (UniProt ID: D6WMX4) 和 *h*PINK1 (UniProt ID: Q9BXM7) 的

序列比较分析,显示激酶结构域同源性约 60%,序列对比结果如图 1 所示.

PINK1 蛋白家族中存在的 3 个独特的插入环 Ins1、Ins2、Ins3,但是插入环 Ins1 的长度在两个种属中存在显著差异,*h*PINK1 中长达 33 个氨基酸残基,而 *Tc*PINK1 中仅有 5 个,但是与底物 Ub 结合相关

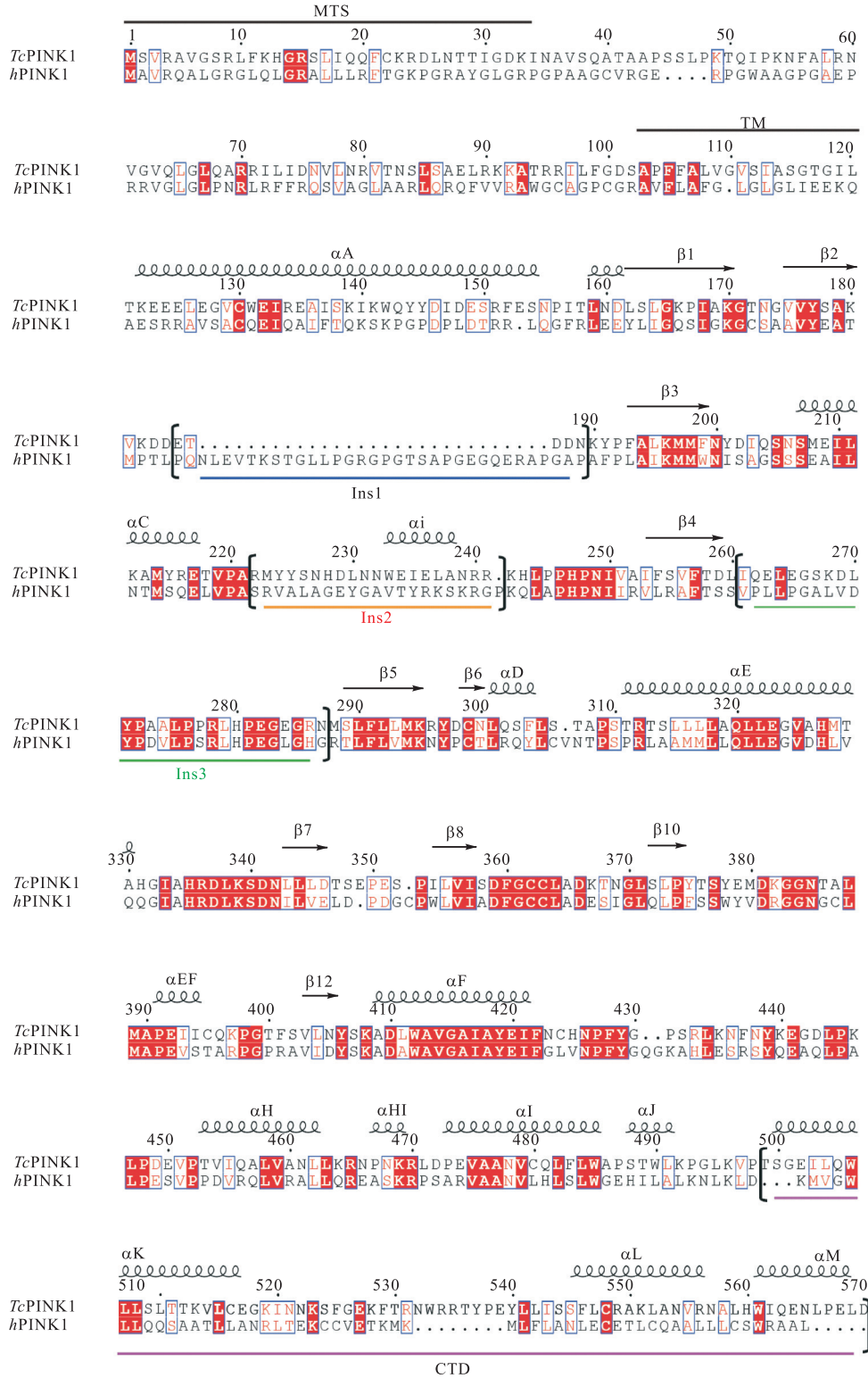


图 1 *Tc*PINK1 与 *h*PINK1 的序列对比  
Fig.1 Sequence comparison of *Tc*PINK1 and *h*PINK1

的 Ins3 片段相对保守;同时 ATP 结合口袋的氨基酸位点 *TcPINK1* (K196-E217) 与 *hPINK1* (K219-E240) 保守度更是高达 71.4%。在激酶结构域中发挥关键作用的 HRD 基序 (*TcPINK1* 中 H335-K339 对应 *hPINK1* 中 H360-K364) 和 DFG 基序 (*TcPINK1* 中 D359-F361 对应 *hPINK1* 中 D384-F386) 氨基酸序列则完全相同。此外, PINK1 活化过程中的关键自磷酸化位点 (*TcPINK1* 中 S205-S207 对应 *hPINK1* 中 S228-S230) 也完全保守。因此, 对 *TcPINK1* 蛋白结构及功能的研究将为理解 *hPINK1* 的分子催化机制提供重要信息。

## 2.2 *TcPINK1* 与 *hPINK1* 的结构对比结果

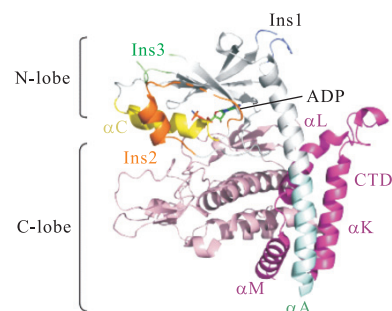
利用 Pymol 对已经解析的 *TcPINK1* (PDB ID: 7MP9) 的结构绘图, 如图 2(a) 所示。N 端的  $\alpha A$  形成一个长螺旋与 CTD 上的  $\alpha K$  相互作用, PINK1 蛋白激酶家族所特有的 3 个插入环 Ins1、Ins2、Ins3 由于其灵活性, 在结构中缺失; 激酶中起重要调节作用的  $\alpha C$  向外伸展。

利用 AlphaFold 3 对 *hPINK1* 蛋白的结构进行了预测。AlphaFold 3 作为新一代预测蛋白的工具, 通过对 PDB 数据库不断地学习, 大大加深了对蛋白结构预测的准确性。之后对最优的结构进行分析, 如图 2(b) 所示, *hPINK1* 中 Ins1 远长于 *TcPINK1* 的 Ins1, Ins3 折叠成两个小螺旋覆盖在 N-lobe 上, 而 Ins2 折叠成的两个小螺旋与  $\alpha C$  相互作用, 使  $\alpha C$  螺旋弯曲成 C 型, 由于  $\alpha C$  直接参与激酶活性的调节, 推测 Ins2 会通过  $\alpha C$  参与活性调节。

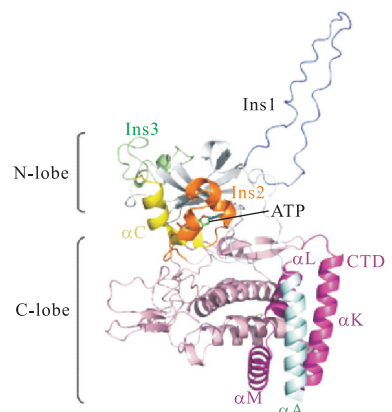
本研究将 *TcPINK1* 的结构与 *hPINK1* 的结构进行叠加对比, 如图 2(c) 所示, 483 个氨基酸的 RMSD 值为 0.096 5 nm, 可见其结构具有高度同源性, 其中 C-lobe 结构更为保守。 *TcPINK1* 与 *hPINK1* 的激酶结构域在一级序列和三级结构上都高度保守; 而其 N 端的  $\alpha A$  和 PINK1 家族所特有的 CTD 结构域一级序列差异大, 但在三级结构中高度保守。CTD 折叠成 3 个  $\alpha$  螺旋 ( $\alpha K$ 、 $\alpha L$  和  $\alpha M$ ),  $\alpha A$  则与 CTD 上的  $\alpha K$  形成相互作用。由于 *hPINK1* 蛋白在大肠杆菌中表达会形成包涵体或无活性的高聚体, 因此对同源蛋白 *TcPINK1* 酶促动力学的研究可为该蛋白家族的深入探索提供重要信息。

## 2.3 重组表达载体的构建与验证

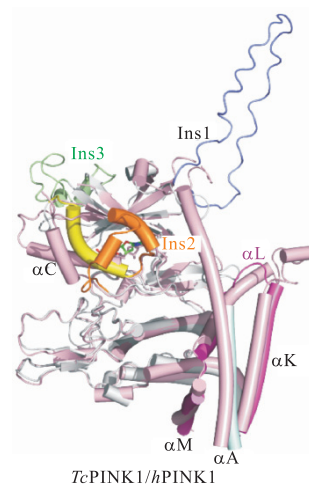
*hPINK1* 在细胞内会被水解为不同长度截短体, 为研究 PINK1 的 N 端对其活性的调节作用, 对比 *hPINK1* 在细胞内的水解片段长度, 本研究设计了 *TcPINK1*<sup>100-570</sup>、*TcPINK1*<sup>117-570</sup> 和 *TcPINK1*<sup>135-570</sup> 3 种



(a) PDB 数据库中 *TcPINK1* (a.a.121-570) 结构 (PDB ID: 7MP9)



(b) AlphaFold 3 对 *hPINK1* (a.a.117-581) 结构预测

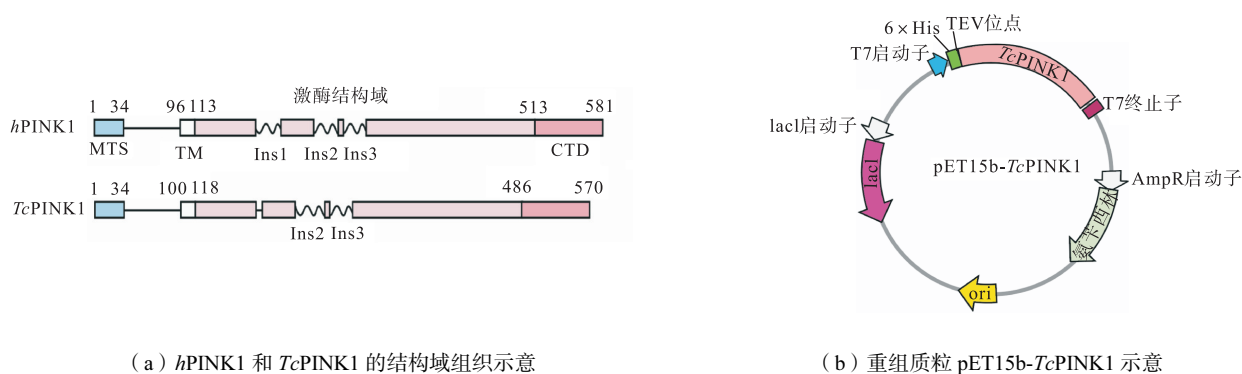


(c) *TcPINK1* 与 *hPINK1* 三维结构整合图

图 2 *TcPINK1* 与 *hPINK1* 的三维结构对比

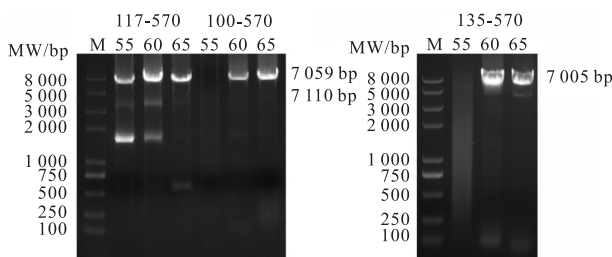
Fig.2 Comparison of the three-dimensional structure of *TcPINK1* and *hPINK1*

截短体, 载体设计如图 3(a) 和 (b) 所示。用不同退火温度 (55 °C、60 °C 和 65 °C) 进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析, 结果如图 3(c) 显示, 扩增基因大小为 7 000 bp 左右, 与预期大小相一致。将目的基因利用 DpnI 酶消化模板后, 产物转化至 *E.coli* Trans1 (T1) 感受态细胞中, 取单克隆菌落过夜培养后提取质粒。质粒经测序验证, 确认成功。



(a) *hPINK1* 和 *TcPINK1* 的结构域组织示意

(b) 重组质粒 pET15b-*TcPINK1* 示意



(c) 高保真 PCR 产生的片段示意

图 3 *TcPINK1* 表达质粒的构建

Fig.3 Construction of the *TcPINK1* expression plasmid

### 2.4 *TcPINK1* 蛋白的表达及纯化

将构建成功的 pET15b-*TcPINK1* 3 种质粒分别转化至 *E.coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 挑取单克隆菌株进行培养, 利用 IPTG 诱导蛋白表达, 经过夜培养后收集菌体, 菌体用高压细胞破碎仪裂解.

在目的蛋白的 N 端融合表达 6 × His 标签, 首先利用 Ni-NTA 亲和层析对蛋白进行初步纯化, 洗脱液中除目的蛋白外仍存在少量杂蛋白. 接着利用 hitrap desalting 柱脱盐处理后, 根据蛋白表面带电性质进行阴离子交换层析, 对目的蛋白进一步提纯, 收集含目的蛋白的洗脱峰进行 SDS-PAGE 检测, 发现此时目的蛋白带电性均一旦纯度有所提高. 最后利用 Superdex 200 分子筛根据分子质量大小进一步分离纯化.

*TcPINK1*<sup>100-570</sup> 蛋白 3 个洗脱峰位置分别在 10.0 mL、12.0 mL 和 13.6 mL; *TcPINK1*<sup>117-570</sup> 蛋白两个洗脱峰位置分别在 12.0 mL 和 13.5 mL; *TcPINK1*<sup>135-570</sup> 蛋白的洗脱峰位置在 12.2 mL. 分子筛纯化的蛋白样品的 SDS-PAGE 电泳结果如图 4(b)、(d) 和 (f) 所示. 根据蛋白质序列分析, 3 个蛋白的大小分别为 53.0 kDa、51.5 kDa 和 49.3 kDa. 通过 SDS-PAGE 电泳分离并与已知标准蛋白进行分子质量对比可知, 所分离纯化的目的蛋白分子质量与预期相符, 纯度均大于 95%, 适于后续酶活性实验.

此外, 对比 3 个蛋白的分子筛洗脱峰(图 5), 并与标准品的洗脱曲线比较(12 mL 左右为二体位置, 13.5 mL 为单体位置), 发现 *TcPINK1*<sup>117-570</sup> 在溶液中主要以单体形式存在, 而 *TcPINK1*<sup>135-570</sup> 主要以二体形式存在. *TcPINK1*<sup>100-570</sup> 主要为单体, 但存在有超高聚的状态, 推测是由于 N 端存在的跨膜螺旋的疏水性引起了蛋白聚集.

### 2.5 Phos-tag SDS-PAGE 电泳对 *TcPINK1* 蛋白的活性检测

将 Ub 分子上标记 FITC, 使底物及产物可视化, 利用 Phos-tag SDS-PAGE 电泳技术, 使磷酸化泛素(pUb)和非磷酸化泛素(Ub)进行分离, 从而对激酶的催化活性进行定量分析(3 次重复实验用不同颜色的点代表, 取 3 次实验的平均值, 并计算标准方差). 图 6 为 *TcPINK1* 3 种截短蛋白激酶活性对比, 其中 M 为单体, D 为二体. 图 6 结果显示, *TcPINK1*<sup>117-570</sup> 单体具有最高的催化活性, *TcPINK1*<sup>117-570</sup> 单体活性较 *TcPINK1*<sup>135-570</sup> 单体活性高, 说明 N 端(a.a. 117-134)对激酶有调节作用. *TcPINK1*<sup>117-570</sup> 二体和 *TcPINK1*<sup>135-570</sup> 相比活性没有显著差异. 而 *TcPINK1*<sup>100-570</sup> 二体活性则显著比 *TcPINK1*<sup>135-570</sup> 二体活性低, 说明最 N 端存在的疏水跨膜螺旋会影响激酶活性.

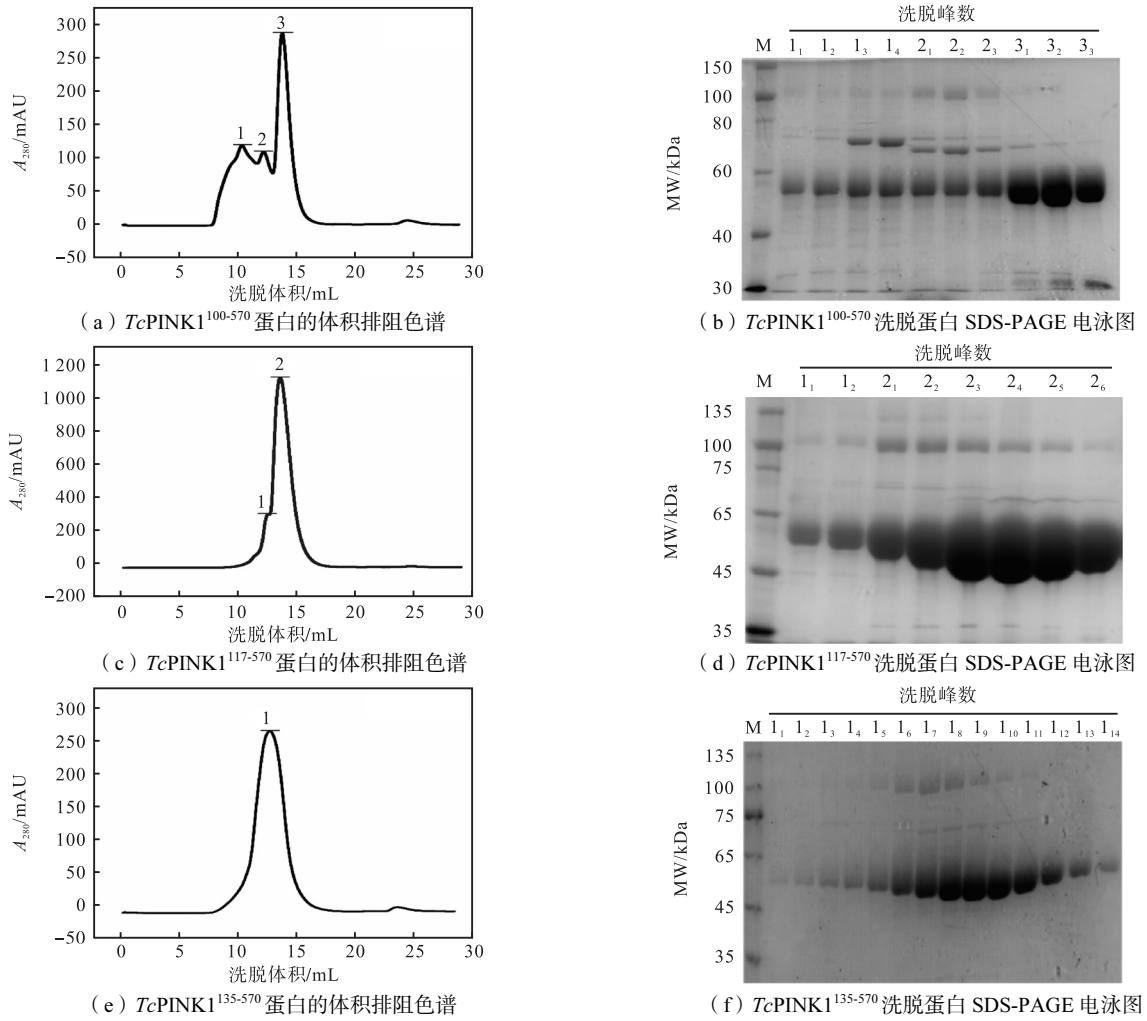


图4 *TcPINK1* 3种截短蛋白的纯化结果

Fig.4 Purification results of three truncated *TcPINK1* proteins

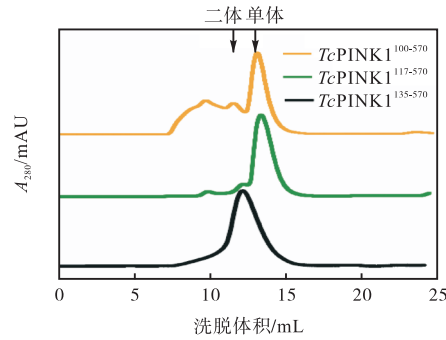


图5 *TcPINK1* 3种截短蛋白体积排阻色谱洗脱位置对比

Fig.5 Comparison of the elution positions of three truncated *TcPINK1* proteins by size exclusion chromatography

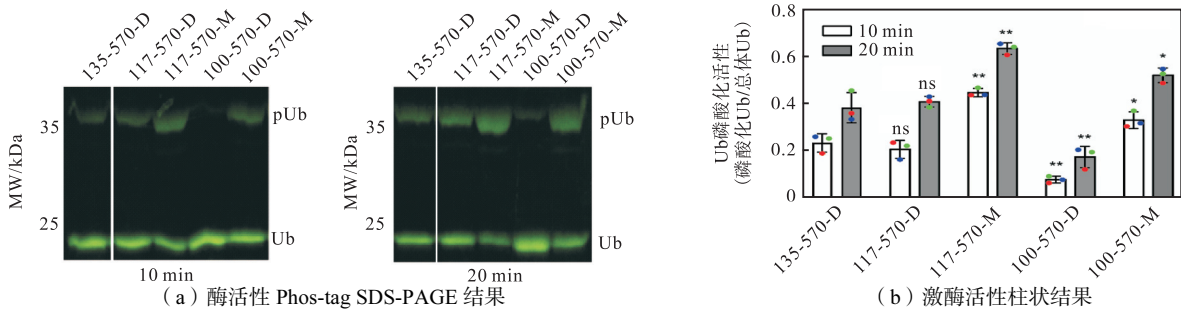


图6 *TcPINK1* 3种截短蛋白激酶活性对比

Fig.6 Comparison of the activities of three truncated *TcPINK1* protein kinases

### 3 讨论

随着全球人口的老齡化进程加速,帕金森氏症(PD)作为第二大常见的神经退行性疾病的发生率逐渐上升,给家庭和社会带来了沉重的负担,成为基础生物学和临床医学亟待攻克的重大挑战之一. PD 的发病机制复杂,涉及环境因素与遗传因素的相互作用. 近年来研究显示线粒体自噬在此类疾病进程中发挥重要作用. PINK1/PARKIN 作为线粒体自噬的重要调控途径,受到广泛关注<sup>[27]</sup>.

泛素调控几乎所有细胞信号通路,而 PINK1 是目前已知的唯一能够磷酸化泛素 Ser65 的泛素激酶<sup>[28]</sup>. 这一磷酸化作用与 PARKIN 的泛素样结构域中丝氨酸残基的磷酸化修饰共同启动了线粒体自噬<sup>[29]</sup>. 作为线粒体损伤的关键传感器,PINK1 活性在时空上的精确调控,对维持细胞功能的正常运行至关重要.

为探究 N 端在细胞中如何精确调节其活性,在本研究中对 *TcPINK1* 的 3 种截短体进行了表达纯化,并在体外检测了其磷酸化活性. 结果显示,*TcPINK1*<sup>117-570</sup> 在溶液中主要以单体形式存在,而 *TcPINK1*<sup>135-570</sup> 则更多地以二体形式存在. *TcPINK1* 的结构以及预测的 *hPINK1* 结构都显示 N 端(a.a.117-134)会形成一个螺旋  $\alpha A$ ,与 CTD 结构域中的  $\alpha K$  相互作用. CTD 结构域在激酶家族中并不常见,通过 DALI 在线搜索,发现酪氨酸激酶家族中的 PEAK1(PDB ID: 6BHC)和 Pragmin(PDB ID: 6EWX)也具有相似的 CTD 结构域,有趣的是这两种蛋白的  $\alpha A$  与对侧的 CTD 结构域相互作用,形成了对称的二体形式(图 7(a)). 将 *TcPINK1*(PDB ID: 7MP9)的结构分别和 PEAK1(PDB ID: 6BHC)和 Pragmin(PDB ID: 6EWX)比较,发现  $\alpha A$  弯曲旋转了约  $30^\circ$ (图 7(b)),破坏了该二体界面的形成,推测这是 *TcPINK1*<sup>117-570</sup> 在溶液中主要以单体形式存在的原因.

令人意外的是,将 N 端(a.a.117-134)完全截掉后,*TcPINK1*<sup>135-570</sup> 又在溶液中形成了二体. 后期的冷冻电镜结构显示,*TcPINK1*<sup>135-570</sup> 形成了“背靠背”的旋转对称的新二体形式,而这种二体形式是后期招募 PARKIN 所必需的. 本研究中 *TcPINK1*<sup>117-570</sup> 显示出更高的酶催化活性,说明不同长度 *TcPINK1* 剪切体可通过 N 端(a.a.117-134)调节蛋白的聚集状态,精细地调节酶活性,以及随后对 PARKIN 的招募活性.

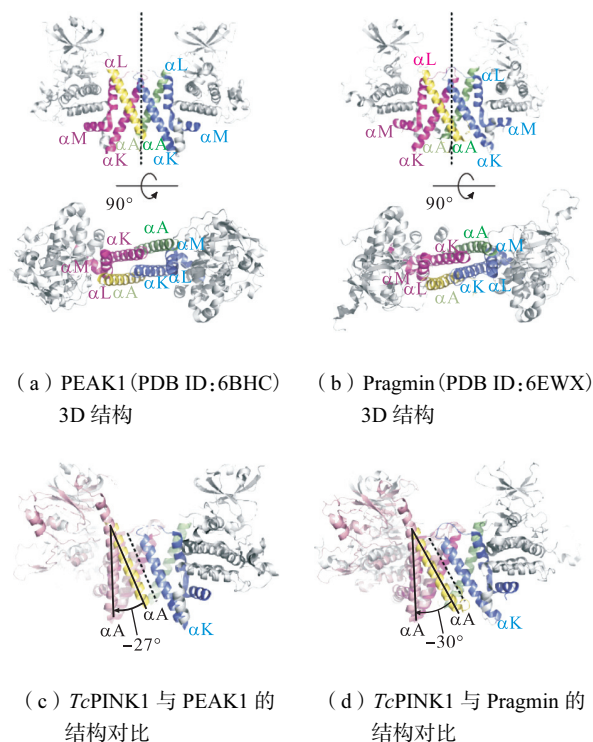


图 7 由 *TcPINK1* 上 N 端(a.a.117-134)参与的蛋白聚集状态的调节

Fig.7 Participation of N-terminal (a.a.117-134) of *TcPINK1* in the regulation of the protein aggregation state

前期实验室尝试在大肠杆菌中表达 *hPINK1*,但发现其形成不溶性的包涵体. 使用 MBP 和 GST (glutathione S-transferase)等标签进行融合表达后,蛋白错误折叠成无活性的高聚体. *TcPINK1* 在大肠杆菌中易表达纯化获得高纯度高活性的蛋白,通过与 *hPINK1* 的序列对比和结构分析,两者的激酶结构域从一级结构到三级结构都高度保守,因而对 *TcPINK1* 功能、酶促动力学及活性调控机制的研究可为 *hPINK1* 的催化机制研究提供有效途径.

### 4 结论

(1) 本研究成功构建了表达 *TcPINK1* 的 3 个不同截短体质粒,将重组表达载体转化入大肠杆菌工程菌,利用 IPTG 进行诱导表达,目的蛋白经 Ni-NTA 亲和层析、阴离子交换层析、分子筛纯化后,蛋白纯度高于 95%.

(2) 分子筛的结果显示,*TcPINK1*<sup>117-570</sup> 相对于 *TcPINK1*<sup>135-570</sup> 更倾向以单体形式存在,显示 N 端(a.a. 117-134)可调节蛋白的聚集状态.

(3) *TcPINK1* 的 3 个不同截短体均显示出磷酸化泛素的活性,且 *TcPINK1*<sup>117-570</sup> 活性较 *TcPINK1*<sup>135-570</sup> 活性高,说明 N 端的  $\alpha A$  对酶活性具有调节作用.

## 参考文献:

- [1] de Virgilio A, Greco A, Fabbri G, et al. Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation[J]. *Autoimmunity Reviews*, 2016, 15(10): 1005-1011.
- [2] Srinivasan E, Chandrasekhar G, Chandrasekar P, et al. Alpha-synuclein aggregation in Parkinson's disease [J]. *Frontiers in Medicine*, 2021, 8: 736978.
- [3] Chaturvedi R K, Beal M F. Mitochondrial approaches for neuroprotection[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1147(1): 395-412.
- [4] Nakka V P, Gusain A, Mehta S L, et al. Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: Multiple neuroprotective opportunities[J]. *Molecular Neurobiology*, 2008, 37: 7-38.
- [5] Nicholls D G, Budd S L. Mitochondria and neuronal survival[J]. *Physiological Reviews*, 2000, 80(1): 315-360.
- [6] Wang R, Wang G H. Autophagy in mitochondrial quality control[J]. *Autophagy: Biology and Diseases*, 2019, 1206: 421-434.
- [7] Li J, Yang D M, Li Z P, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in neurodegenerative diseases[J]. *Ageing Research Reviews*, 2023, 84: 101817.
- [8] Wang Y, Liu N, Lu B W. Mechanisms and roles of mitophagy in neurodegenerative diseases[J]. *CNS Neuro-Science & Therapeutics*, 2019, 25(7): 859-875.
- [9] Bayne A N, Trempe J F. Mechanisms of PINK1, ubiquitin and Parkin interactions in mitochondrial quality control and beyond[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019, 76: 4589-4611.
- [10] Wang S Y, Li H Y, Yuan M H, et al. Role of AMPK in autophagy[J]. *Frontiers in Physiology*, 2022, 13: 1015500.
- [11] Kalderon B, Pines O. Protein folding as a driving force for dual protein targeting in eukaryotes[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2014, 1: 23.
- [12] Deas E, Plun-Favreau H, Gandhi S, et al. PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL[J]. *Human Molecular Genetics*, 2011, 20(5): 867-879.
- [13] Jin S M, Lazarou M, Wang C, et al. Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL[J]. *Journal of Cell Biology*, 2010, 191(5): 933-942.
- [14] Antico O, Thompson P W, Hertz N T, et al. Targeting mitophagy in neurodegenerative diseases[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2025, 24: 276-299.
- [15] Malpartida A B, Williamson M, Narendra D P, et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's disease: From mechanism to therapy[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2021, 46(4): 329-343.
- [16] Voges L. Molecular Characterisation of Parkin-Associated Parkinsonism in a Human Cellular Model[D]. Germany: Zentrale Hochschulbibliothek Lübeck, 2014.
- [17] Rasool S, Trempe J F. New insights into the structure of PINK1 and the mechanism of ubiquitin phosphorylation[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 53(5): 515-534.
- [18] Rasool S, Soya N, Truong L, et al. PINK1 autophosphorylation is required for ubiquitin recognition[J]. *EMBO Reports*, 2018, 19(4): e44981.
- [19] Paul S, Pickrell A M. Hidden phenotypes of PINK1/Parkin knockout mice[J]. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA) — General Subjects*, 2021, 1865(6): 129871.
- [20] Gispert S, Ricciardi F, Kurz A, et al. Parkinson phenotype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration[J]. *PLoS One*, 2009, 4(6): e5777.
- [21] Woodroof H I, Pogson J H, Begley M, et al. Discovery of catalytically active orthologues of the Parkinson's disease kinase PINK1: Analysis of substrate specificity and impact of mutations[J]. *Open Biology*, 2011, 1(3): 110012.
- [22] 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.
- [23] Gan Z Y, Callegari S, Cobbold S A, et al. Activation mechanism of PINK1[J]. *Nature*, 2022, 602(7896): 328-335.
- [24] Rasool S, Veyron S, Soya N, et al. Mechanism of PINK1 activation by autophosphorylation and insights into assembly on the TOM complex[J]. *Molecular Cell*, 2022, 82(1): 44-59.
- [25] 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.
- [26] Greene A W, Grenier K, Aguilera M A, et al. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment[J]. *EMBO Reports*, 2012, 13(4): 378-385.
- [27] Narendra D P, Youle R J. The role of PINK1-Parkin in mitochondrial quality control[J]. *Nature Cell Biology*, 2024, 26(10): 1639-1651.
- [28] Koyano F, Okatsu K, Kosako H, et al. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin[J]. *Nature*, 2014, 510(7503): 162-166.
- [29] Durcan T M, Fon E A. The three 'P's of mitophagy: PARKIN, PINK1, and post-translational modifications [J]. *Genes & Development*, 2015, 29(10): 989-999.

(责任编辑: 田 军)