

技术与方法

ATP依赖的人Lon蛋白酶的表达、纯化及其活性鉴定

姚蔚^{1,4#} 夏雷^{1,2,3#} 刘永章^{1,3,4#} 黎真^{1,3,4} 王璐^{1,2,3} 吕斌^{1,2,3,4*}¹温州医学院生物物理研究所, 温州 325035; ²温州医学院Attardi线粒体生物医学研究院, 温州 325035;³浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035; ⁴温州医学院检验医学与生命科学学院生物系, 温州 325035)

摘要 ATP依赖的人Lon蛋白酶是一种同质寡聚、环状的蛋白酶, 主要位于细胞线粒体基质中。许多研究表明, Lon蛋白酶对于维护细胞的内环境稳定起着重要作用, 并参与线粒体蛋白质量控制和代谢调控。将pPROEX1 His₆-Lon重组质粒在*Escherichia coli* Rosetta 2菌株中诱导表达用Ni²⁺柱亲和和层析法纯化, 获得纯度较高的目的蛋白。经纯化后, Lon蛋白酶的比酶活达到0.17 U/mg。通过多肽底物Rhodamine 110、bis-(CBZ-L-alanyl-L-alanine amide)[(Z-AA)₂ Rh110]的降解检测显示, Lon蛋白酶具有肽酶活性, 并被ATP所刺激。Casein和线粒体转录因子A降解实验表明, 纯化的Lon蛋白酶具有蛋白水解活性, 而且蛋白水解活性依赖于ATP。

关键词 线粒体; Lon蛋白酶; 蛋白纯化; 蛋白酶活性

哺乳动物细胞线粒体主要含有4种ATP依赖的蛋白酶, 它们分别是: Lon、ClpXP和AAA蛋白酶(包括iAAA和m-AAA, 它们的催化活性部位分别位于线粒体膜层空间和基质)^[1]。Lon蛋白酶最早在大肠杆菌中被发现, 也称为La蛋白酶^[2]。在许多生物中, 从古生菌、原核生物、真菌到哺乳动物的线粒体和过氧化物酶体, 以及植物的线粒体和叶绿体中都发现了Lon的同源蛋白。Lon的蛋白酶活性对于维护细胞的内环境稳定、参与线粒体蛋白质量控制和代谢调控起着重要作用, 对于植物耐受逆境的能力也起着关键作用。人Lon蛋白酶由核基因编码^[3], 包含959个氨基酸, 是一种同质寡聚环状的ATP依赖的蛋白酶。Lon蛋白酶含有三个功能结构域, 即N端结构域, 它对于识别与结合底物极为关键; ATP酶结构域(也称为AAA⁺模块), 它含有两个基序, 即 α/β 结构域和 α 区域, 分别参与结合和水解ATP; 最后一个是P结构域, 具有蛋白水解活性。除了调控ATP依赖的蛋白降解之外, Lon蛋白酶也具有分子伴侣的功能^[4]。不仅如此, Lon蛋白酶还具有与DNA结合的特性^[5-8]。我们的研究发现, Lon倾向于结合在D-loop区(也叫mtDNA控制区)^[9]。近年来, 越来越多的研究发现, Lon蛋白酶与衰老^[10]、癌症^[11]以及各种疾病如脂肪代谢障碍^[12]等都存在着紧密的关系。

目前, 国内对于人Lon蛋白酶的研究较少, 薛霞

等^[13-14]和张雁林等^[15]研究了Lon蛋白酶下调对肿瘤细胞的生物学效应。本文通过将重组质粒转化*E. coli* Rosetta 2菌株, 使目的蛋白进行上清表达, 通过一次亲和层析对带有His₆-tag标签的重组蛋白Lon进行纯化, 获得了较高纯度的Lon蛋白酶, 并对纯化的Lon蛋白酶进行ATP酶、肽酶和蛋白酶活性鉴定, 确定纯化的蛋白保留相应的酶活性。它的纯化为我们进一步进行Lon蛋白酶的体外实验、Lon蛋白酶晶体结构研究提供了条件, 也为我们从天然产物或合成小分子化合物中进行高通量筛选Lon蛋白酶的抑制剂和激活剂、研发作用于Lon蛋白酶的药物奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 原核表达载体pVEX/hLon为美国国家癌症研究所M. Maurizi实验室提供; pPROEX1 His₆-hLon由本实验室和美国新泽西医学院生物化学系Carolyn Suzuki实验室合作构建和保存。大肠

收稿日期: 2012-04-26 接受日期: 2012-06-11

国家自然科学基金(No.31070710, No.31171345)、浙江省钱江人才B基金(No.2010R10045)、温州医学院科研启动基金(No.QTJ09010)、教育部留学回国人员科研启动基金、温州市科技局对外合作基金(No.H20100064)和浙江省自然科学基金(No.Y2110097)资助项目

*共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0577-86699722, E-mail: lubmito@wzmc.edu.cn

杆菌Rosetta 2购自EMD Millipore。

1.1.2 主要试剂 LB broth、TB broth、异丙基硫代半乳糖苷(Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG)、ATP购自美国Sigma公司; 蛋白分子量标准Marker、丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺购自美国Bio Rad公司; QuantiChrom™ ATPase/GTPase Assay Kit购自美国BioAssay Systems公司; (Z-AA)₂ Rh110购自美国AnaSPEC公司; BCA蛋白测定试剂盒购自美国Thermo Scientific公司; Casein为本实验室所保存; Ni-NTA购自QIAGEN公司; 多克隆兔抗Lon由南京金斯瑞生物科技有限公司制备; 单克隆鼠抗TFAM抗体为上海艾比玛特生物医药公司制备; HRP标记山羊抗兔及兔抗鼠IgG二抗购自Santa Cruz公司。

1.1.3 主要仪器 Ultrasonic liquid processor超声破碎仪(美国Misonix公司); TL-1000 Ultracentrifuge超速离心机(Beckman公司); Genesys 10vis分光光度计(Thermo Fisher Scientific公司); Thermolyne type 37 900 culture Incubator培养箱(日本SANYO公司); MS LAUDA水浴箱(美国LAUDA公司); Vector酶标仪(美国PerkinElmer公司)。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒pPROEX1 His₆-hLon的构建 将pVEX11/hLON中含有Lon蛋白酶cDNA的*Nde* I-*Bam*HI片段用限制性内切酶进行酶切。将含有多组氨酸标签的proEx-1载体用相同的限制性内切酶进行酶切并将Lon cDNA片段与载体连接, PCR鉴定并测序。

1.2.2 重组质粒Lon细胞的诱导表达 将pPROEX1 His₆-hLon重组质粒转化感受态表达菌Rosetta 2, 铺入LB琼脂平板上倒置培养, 挑取阳性菌落接种于3 mL含氨苄青霉素和氯霉素的LB培养基, 37 °C振荡培养12 h, 2%的接种量转接于30 mL新鲜的LB培养基, 使起始 $D_{600}=0.05\sim 0.1$, 37 °C振荡培养至 D_{600} 为0.8, 在各管中分别加入IPTG至终浓度为0.1 mmol/L、1 mmol/L, 分别于25 °C、37 °C进行诱导表达3 h, 分别在0, 30, 60, 90, 120, 180 min时收集1 mL菌液, 收集菌体。用1 mL 1 mol/L Tris-HCl(pH8.0)重悬, 进行免疫印迹分析并选择较优的表达条件。

1.2.3 重组菌的纯化 根据较优的表达条件进行诱导表达, 离心后去上清收集菌液, 沉淀称重, 于-80 °C保存或置冰上备用。Ni-NTA树脂2 mL预先用5倍树脂体积的Buffer A(50 mmol/L Hepes、300 mmol/L NaCl、20%甘油、10 mmol/L MgCl₂,

pH8.0)在4 °C平衡。用Buffer A重悬细菌, 1 g菌体悬浮于4 mL Buffer A。在冰上进行超声破碎至菌液澄清, 100 000×g, 4 °C离心15 min, 收集上清液。将收集的上清液以15 mL/h的流速流过预先平衡的Ni-NTA树脂, 使重组蛋白结合在树脂上。用20 mL洗涤缓冲液Wash Buffer(50 mmol/L Hepes、150 mmol/L NaCl、20%甘油、10 mmol/L MgCl₂、40 mmol/L imidazole, pH8.0)以15 mL/h的流速洗涤树脂, 除去非特异性结合的杂蛋白。分别用1.5 mL含100, 200, 300 mmol/L咪唑的洗脱缓冲液(50 mmol/L Hepes、150 mmol/L NaCl、20%甘油、10 mmol/L MgCl₂, pH8.0)以10 mL/h的流速洗涤树脂, 分步收集含有目标蛋白的洗脱液。用BCA蛋白定量分析试剂盒测定重组蛋白浓度。纯化后蛋白分装贮备于-80 °C冰箱中备用。从上清、穿透液和各洗脱液中分别吸取样品, 进行12% SDS-PAGE分析。

1.2.4 重组蛋白的鉴定 取20 μ L纯化的重组蛋白加5 μ L 5×蛋白电泳上样缓冲液, 于95 °C加热5 min, 进行12% SDS-PAGE。电泳结束后进行考马氏亮蓝染色, 或用半干电转移系统将蛋白转移到硝酸纤维素膜上进行免疫印迹分析。3%脱脂奶粉封闭硝酸纤维素膜1 h, 加入兔抗人Lon抗体于室温孵育1 h, 用PBS洗涤三次, 每次10 min; 再与羊抗兔-HRP抗体孵育1 h, 用PBS洗涤三次后用ECL检测, 在暗室中曝光到X光片上。

1.2.5 ATP酶活性测定 严格按QuantiChrom™ ATPase/GTPase Assay Kit试剂盒说明^[16]。根据定义, 以1个单位的酶活力(1 U)为每1分钟催化产生1 μ mol磷酸根所需的酶量计算纯化蛋白的酶活性。

1.2.6 肽酶活性测定 倍比稀释配制目的蛋白, 使蛋白浓度分别为1 600, 800, 400, 200, 0 nmol/L, 吸取10 μ L依次加入384孔板中; 加入底物Rho AA, 加或不加ATP, 使Rho AA和ATP的终浓度分别为6 μ mol/L和2 mmol/L; 空白对照管: 以洗脱液代替酶液同样条件操作。将反应混合液于37 °C孵育3 h, 在485/535 nm处测定荧光值。

1.2.7 蛋白酶活性测定 取底物13.5 μ L Casein (67 μ mol/L)、7.5 μ L酶液(8.1 μ mol/L)、4.5 μ L ATP (100 mmol/L)、9 μ L BSA(1 mg/ μ L)、55.5 μ L缓冲液(50 mmol/L Hepes、150 mmol/L NaCl、10 mmol/L MgCl₂, pH8.0)混合, 在37 °C下孵育60 min。空白对照管: 不加ATP, 相同条件操作。在0, 15, 30, 60 min时, 分

别从反应混合液中吸取20 μL , 加入5 μL 5 \times 上样缓冲液, 于95 $^{\circ}\text{C}$ 加热变性, 进行免疫印迹分析。

1.2.8 TFAM降解实验 取4.5 μL TFAM (6 $\mu\text{mol/L}$)、7.5 μL 酶液(8.1 $\mu\text{mol/L}$)、4.5 μL ATP (100 mmol/L)、9 μL BSA(1 $\text{mg}/\mu\text{L}$)、64.5 μL 缓冲液(50 mmol/L Hepes、150 mmol/L NaCl、10 mmol/L MgCl_2 , pH8.0)混合, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育60 min。空白对照管: 不加ATP, 相同条件操作。在0, 15, 30, 60 min时, 分别从反应混合液中吸取20 μL , 加入5 μL 5 \times 上样缓冲液, 于95 $^{\circ}\text{C}$ 加热变性, 进行免疫印迹分析。

2 结果

2.1 重组蛋白的诱导表达

将选出的重组蛋白在两个温度即37 $^{\circ}\text{C}$ 和25 $^{\circ}\text{C}$ 下的最佳可溶性表达条件同时进行免疫印迹鉴定(图1), 发现在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 获得较25 $^{\circ}\text{C}$ 更多的蛋白表达量, 同时利用ImageJ进行定量, Lon在诱导3 h后较1.5 h和2 h有更高的表达量(分别增加近20%和15%)。因此, Lon重组蛋白较优的表达条件为: 37 $^{\circ}\text{C}$ 下IPTG浓度为1 mmol/L 诱导3 h。

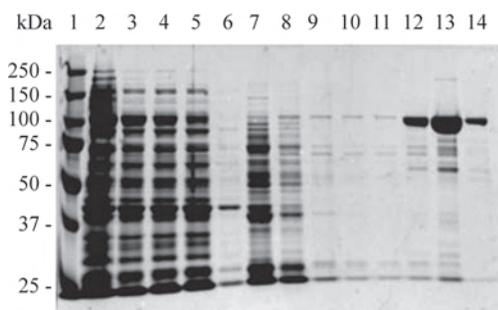
2.2 重组蛋白的纯化

转化菌Rosetta 2经IPTG诱导3 h, 超声破碎后, 离心收集上清, 通过Ni-NTA树脂进行亲和纯化, 经SDS-PAGE分析(每孔上样20 μL), 在洗脱液中显示出纯度较高的条带。由图2可见, 在分子量106 kDa处出现特异性条带, 这与预期的His₆-Lon重组蛋白理论大小相一致。图3为洗脱的蛋白样品进行免疫印迹

后的结果(每孔的蛋白含量一致), 表明纯化出来的蛋白即目的蛋白Lon。经BCA蛋白浓度检测, 洗脱液中的重组蛋白浓度分别达到0.76, 0.81, 0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (具代表性的一次), 可获得2.54 mg 的总蛋白量。

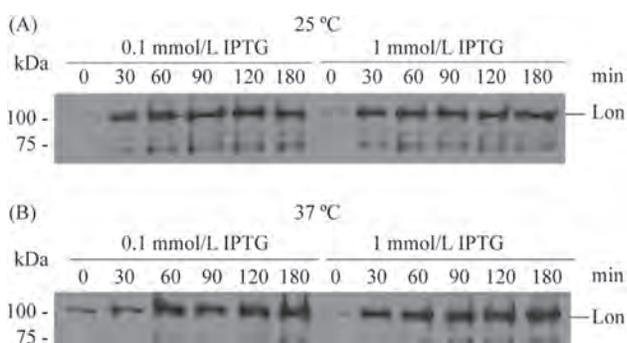
2.3 酶活性分析

2.3.1 ATP酶活性分析 以ATP为底物, 将ATP水解为ADP和游离的磷酸根离子, 通过在620 nm波长下检测吸光值, 计算得到目的蛋白的ATPase活性。严格根据试剂盒的实验步骤, 绘制标准曲线, 目的蛋白Lon在缓冲液中反应后, 经标准曲线换算, 测定其酶活, 测得Lon蛋白酶的比活力为0.14 U/mg。



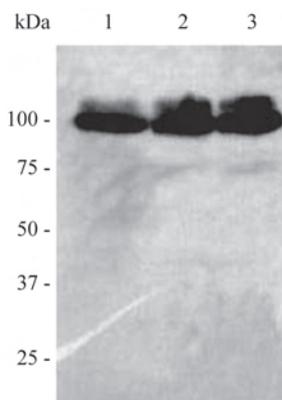
1: marker; 2: 超声后裂解液; 3: 上清液; 4: 穿透液; 5,6: 洗脱液A; 7-11: 洗涤液(40 mmol/L 咪唑); 12-14: 洗脱液(100, 200, 300 mmol/L 咪唑)。1: marker; 2: lysate after sonication; 3: supernatant; 4: flow through; 5,6: buffer A; 7-11: wash buffer(containing 40 mmol/L imidazole); 12-14: elution buffer(containing 100, 200, 300 mmol/L imidazole, respectively).

图2 Lon蛋白纯化的SDS-PAGE分析
Fig.2 SDS-PAGE analysis of Lon purification



A: 25 $^{\circ}\text{C}$ 时, 不同浓度IPTG及诱导时间表达产物的免疫印迹分析; B: 37 $^{\circ}\text{C}$ 时, 不同浓度IPTG及诱导时间表达产物的免疫印迹分析。
A: time-course of induction at 25 $^{\circ}\text{C}$ with 0.1, 1 mmol/L IPTG; B: time-course of induction at 37 $^{\circ}\text{C}$ with 0.1, 1 mmol/L IPTG.

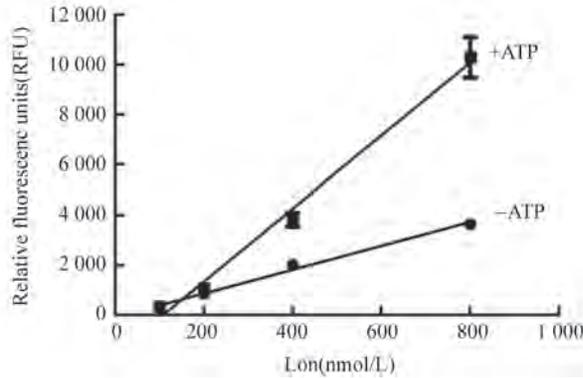
图1 Lon诱导表达条件优化
Fig.1 Optimization of Lon induction



1-3: 洗脱液(100, 200, 300 mmol/L 咪唑)。
1-3: elution buffer(containing 100, 200, 300 mmol/L imidazole, respectively).

图3 纯化后Lon蛋白免疫印迹分析
Fig.3 Western blot analysis of purified Lon

2.3.2 肽酶活性分析 以(Z-AA)₂ Rh110为底物,通过水解寡肽,释放出罗丹明,在相应的波长下测得荧光值,确定蛋白的肽酶活性。水解肽酶活性的结果见图4。结果表明,纯化的Lon蛋白酶具有肽酶活性。在无ATP条件下,Lon蛋白能水解底物Rho AA,表现出较弱的肽酶活性;在ATP存在条件下,Lon蛋



不同浓度Lon蛋白与底物Rho AA在20 μ L反应体系中混匀(50 mmol/L HEPES、150 mmol/L NaCl、10 mmol/L MgCl₂),分别加或不加ATP,37 $^{\circ}$ C孵育3 h后于485/535 nm波长处测荧光值。

Series of concentration of purified Lon(100, 200, 400, 800 nmol/L) was incubated with 6 μ mol/L Rho AA in 20 μ L reaction containing 50 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L MgCl₂ in the presence or absence of 1 mmol/L ATP at 37 $^{\circ}$ C for 3 h, then read at 485/535 nm.

图4 Lon蛋白的肽酶活性测定

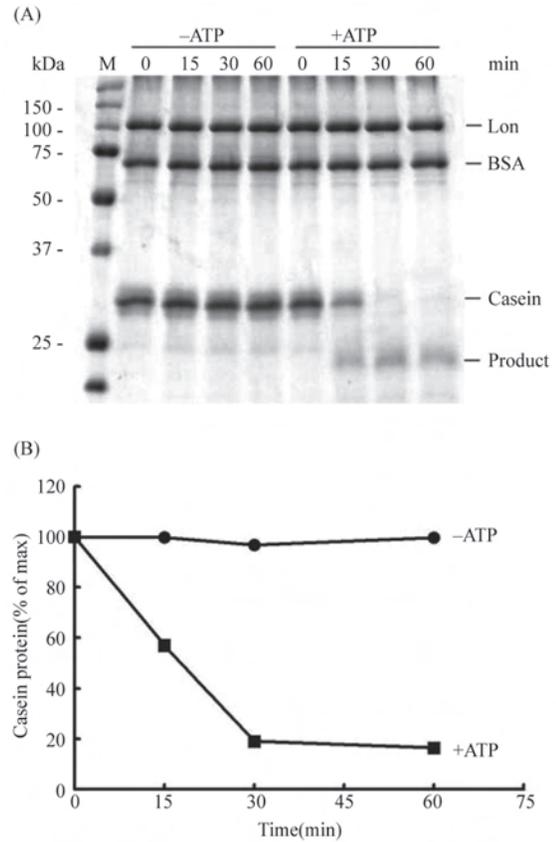
Fig.4 Lon peptidase activity assay

白的肽酶活性受到刺激,肽酶活性明显升高。

2.3.3 蛋白酶活性分析 以Casein为底物,测定Lon的蛋白酶活性。蛋白酶活性测定结果如图5所示,结果显示,在无ATP存在条件下,Lon蛋白不表现出蛋白水解活性,因而底物Casein不被降解,保持稳定;反之,ATP存在时,底物Casein被迅速降解,表明了Lon蛋白具有蛋白酶活性,并且Lon蛋白酶的蛋白水解活性受到ATP的刺激。

2.4 底物降解实验

以纯化的线粒体转录因子A(TFAM)作为底物,检测纯化的Lon蛋白酶对底物的降解活性。结果如图6所示,在无ATP条件下TFAM保持稳定,而ATP存在时,TFAM在1 h内被Lon迅速降解。这与Casein的结果相一致,表明Lon蛋白受ATP的刺激,表现出蛋白酶活性。

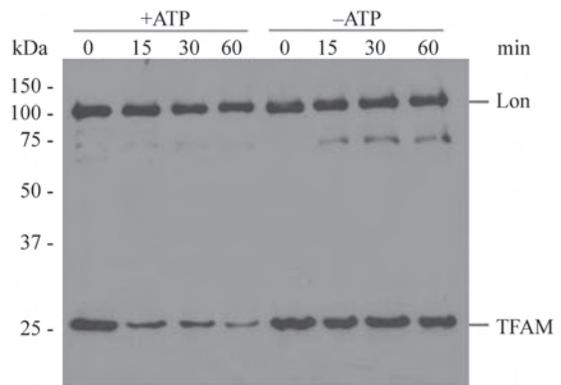


A: Lon体外降解Casein蛋白(考马斯亮蓝染色)。1 μ mol/L Lon降解10 μ mol/L Casein,分别加或不加ATP,在15, 30, 60 min时对降解进行检测; B: ImageJ软件半定量Casein含量。

A: Coomassie blue staining gel of Casein degradation by(1 μ mol/L) in the presence or absence of ATP. Lon degradation of Casein was monitored after 15, 30, 60 min of incubation; B: the percentage of Casein was quantified with ImageJ software.

图5 Lon的蛋白酶活性测定

Fig.5 Lon protease activity assay



Lon(0.3 μ mol/L)蛋白酶与TFAM(0.3 μ mol/L)混合,加或不加ATP,37 $^{\circ}$ C孵育1 h,在0, 15, 30, 60 min时取样进行免疫印迹分析。

In vitro degradation of TFAM(0.3 μ mol/L) by Lon(0.3 μ mol/L) in the presence or absence of ATP. Lon degradation of TFAM was monitored after 15, 30, 60 min of incubation.

图6 Lon蛋白酶降解TFAM

Fig.6 Time-course of TFAM degradation by Lon

3 讨论

近年来,对于Lon蛋白酶的研究越来越热门,对Lon蛋白酶的功能倍加关注。Lon蛋白酶作为质量控制蛋白,主要的作用就是对细胞内错误折叠或受损伤的蛋白进行选择性的降解。Granot^[17]和Tian^[18]实验室分别发现StAR蛋白和5-氨基酮戊酸合成酶1(5-aminolevulinic acid synthase 1, ALAS1)是Lon蛋白酶的底物;Kaguni实验室^[19]发现,在果蝇细胞中,TFAM也是Lon蛋白酶的底物。Lon蛋白酶是天然的抗氧化剂。最近,Ngo等^[20]发现在衰老的细胞中,Lon蛋白酶水平很低,受损伤的蛋白在细胞内大量积累。在小鼠^[21]、大鼠^[22-23]、子囊菌柄孢霉^[24-25]等模式生物中的研究表明,Lon蛋白酶与衰老、寿命有紧密关系。因而,获得纯化的Lon蛋白酶对于研究Lon蛋白酶的性质和功能有着十分重要的意义。

本实验对转化的重组蛋白进行诱导表达,从菌株、温度、诱导时间和IPTG浓度等方面进行了初步的摸索,获得了较好的诱导表达条件。结果表明,利用终浓度1 mmol/L IPTG在37 °C诱导3 h,获得了较好的蛋白表达。通过一次亲和层析,获得了相对较纯的Lon蛋白,本实验方法简便,成本低廉,为以后大规模生产高纯度的该蛋白提供了可能。带有His₆-tag的Lon分子量约为106 kDa,与理论分子量十分接近,经免疫印迹鉴定即为目的蛋白。虽然在Rosetta菌株中,我们也得到了纯度较高的Lon蛋白酶,但是纯化的Lon蛋白酶只有较弱的活性,因而我们重新选用了Rosetta 2菌株。通过对纯化的Lon蛋白酶的ATP酶、肽酶和蛋白酶活性的测定,说明此纯化的蛋白保持着活性,能利用ATP提供的能量水解降解寡肽链和蛋白底物。自从30年前在大肠杆菌中第一次发现Lon蛋白酶以来,世界上包括本课题组在内的许多实验室一直尝试于Lon蛋白全酶的晶体结构研究,但至今依然没有获得成功。迄今为止,对于Lon蛋白酶结构的了解都是基于电子显微镜以及蛋白部分结构或亚结构域的结晶^[26-28]。Lon蛋白酶的纯化条件的优化为我们今后进一步开展人Lon蛋白酶的结晶以及晶体结构的解析、明确其结构和功能的关系、进一步寻找Lon蛋白酶的抑制剂及激活剂以及基于Lon蛋白酶的药物开发和基因治疗等研究奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 Leidhold C, Voos W. Chaperones and proteases-guardians of protein integrity in eukaryotic organelles. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1113: 72-86.
- 2 Swamy KH, Goldberg AL. *E. coli* contains eight soluble proteolytic activities, one being ATP dependent. *Nature* 1981; 292(5824): 652-4.
- 3 Wang N, Gottesman S, Willingham MC, Gottesman MM, Maurizi MR. A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(23): 11247-51.
- 4 Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 2007; 129(1): 111-22.
- 5 Fu GK, Markovitz DM. The human LON protease binds to mitochondrial promoters in a single-stranded, site-specific, strand-specific manner. *Biochemistry* 1998; 37(7): 1905-9.
- 6 Liu T, Lu B, Lee I, Ondrovicova G, Kutejova E, Suzuki CK. DNA and RNA binding by the mitochondrial lon protease is regulated by nucleotide and protein substrate. *J Biol Chem* 2004; 279(14): 13902-10.
- 7 Chen SH, Suzuki CK, Wu SH. Thermodynamic characterization of specific interactions between the human Lon protease and G-quartet DNA. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(4): 1273-87.
- 8 Lu B, Liu T, Crosby JA, Thomas-Wohlever J, Lee I, Suzuki CK. The ATP-dependent Lon protease of *Mus musculus* is a DNA-binding protein that is functionally conserved between yeast and mammals. *Gene* 2003; 306: 45-55.
- 9 Lu B, Yadav S, Shah PG, Liu T, Tian B, Puksza S, *et al.* Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance. *J Biol Chem* 2007; 282(24): 17363-74.
- 10 Ngo JK, Davies KJ. Importance of the lon protease in mitochondrial maintenance and the significance of declining lon in aging. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1119: 78-87.
- 11 Bulteau AL, Bayot A. Mitochondrial proteases and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1807(6): 595-601.
- 12 Pinti M, Gibellini L, Guaraldi G, Orlando G, Gant TW, Morselli E, *et al.* Upregulation of nuclear-encoded mitochondrial LON protease in HAART-treated HIV-positive patients with lipodystrophy: Implications for the pathogenesis of the disease. *AIDS* 2010; 24(6): 841-50.
- 13 薛霞,朱运峰,毛建平. 利用RNA干扰技术下调Lon基因表达的生物学效应研究. 海南医学院学报(Xue Xia, Zhu Yunfeng, Mao Jianping. The function investigation of Lon gene expression by down-regulation in MCF7. *Journal of Hainan Medical College*) 2006; 12(6): 502-6.
- 14 薛霞,朱运峰,毛建平. RNAi抑制MCF7细胞Lon基因后的生物学效应. 南方医科大学学报(Xue Xia, Zhu Yunfeng, Mao Jianping. Effect of RNA for Lon silencing on growth and apoptosis of human breast cancer MCF7 cells. *J South Med Univ*) 2007; 27(6): 870-4.
- 15 张雁林,朱运峰,李莎,高峻钰. LON基因下调乳腺癌细胞MCF-7的增殖以及药物敏感性的影响. 军事医学科学院院刊(Zhang Yanlin, Zhu Yunfeng, Li Sha, Gao Junyu. Effect of downregulation of mitochondrial protease LON by RNAi on cell

- proliferation and drug sensitivity of human breast carcinoma cell line MCF-7. *Bull Acad Mil Med Sci* 2006; 30(4): 306-14.
- 16 Bender T, Lewrenz I, Franken S, Baitzel C, Voos W. Mitochondrial enzymes are protected from stress-induced aggregation by mitochondrial chaperones and the Pim1/LON protease. *Mol Biol Cell* 2011; 22 (5): 541-54.
- 17 Granot Z, Kobiler O, Melamed-Book N, Eimerl S, Bahat A, Lu B, *et al.* Turnover of mitochondrial steroidogenic acute regulatory (StAR) protein by Lon protease: the unexpected effect of proteasome inhibitors. *Mol Endocrinol* 2007; 21(9): 2164-77.
- 18 Tian Q, Li T, Hou W, Zheng J, Schrum LW, Bonkovsky HL. Lon peptidase 1 (LONP1)-dependent breakdown of mitochondrial 5-aminolevulinic acid synthase protein by heme in human liver cells. *J Biol Chem* 2011; 286(30): 26424-30.
- 19 Matsushima Y, Goto Y, Kaguni LS. Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM). *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(43): 18410-5.
- 20 Ngo JK, Pomatto LC, Bota DA, Koop AL, Davies KJ. Impairment of lon-induced protection against the accumulation of oxidized proteins in senescent wi-38 fibroblasts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011; 66(11): 1178-85.
- 21 Bota DA, van Remmen H, Davies KJ. Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. *FEBS Lett* 2002; 532(1/2): 103-6.
- 22 Bakala H, Delaval E, Hamelin M, Bismuth J, Borot-Laloi C, Corman B, *et al.* Changes in rat liver mitochondria with aging. Lon protease-like reactivity and N(epsilon)-carboxymethyllysine accumulation in the matrix. *Eur J Biochem* 2003; 270(10): 2295-302.
- 23 Delaval E, Perichon M, Friguet B. Age-related impairment of mitochondrial matrix aconitase and ATP-stimulated protease in rat liver and heart. *Eur J Biochem* 2004; 271(22): 4559-64.
- 24 Luce K, Osiewacz HD. Increasing organismal healthspan by enhancing mitochondrial protein quality control. *Nat Cell Biol* 2009; 11(7): 852-8.
- 25 Scheckhuber CQ, Houthoofd K, Weil AC, Werner A, de Vreese A, Vanfleteren JR, *et al.* Alternative oxidase dependent respiration leads to an increased mitochondrial content in two long-lived mutants of the aging model *Podospora anserina*. *PLoS One* 2011; 6(1): e16620.
- 26 Botos I, Melnikov EE, Cherry S, Khalatova AG, Rasulova FS, Tropea JE, *et al.* Crystal structure of the AAA+ alpha domain of *E. coli* Lon protease at 1.9A resolution. *J Struct Biol* 2004; 146(1/2): 113-22.
- 27 Melnikov EE, Andrianova AG, Morozkin AD, Stepnov AA, Makhovskaya OV, Botos I, *et al.* Limited proteolysis of *E. coli* ATP-dependent protease Lon-a unified view of the subunit architecture and characterization of isolated enzyme fragments. *Acta Biochim Pol* 2008; 55(2): 281-96.
- 28 Park SC, Jia B, Yang JK, Van DL, Shao YG, Han SW, *et al.* Oligomeric structure of the ATP-dependent protease La (Lon) of *Escherichia coli*. *Mol Cells* 2006; 21(1): 129-34.

Expression and Purification of ATP-dependent Human Lon Protease and Characterization of its Enzymatic Activity

Yao Wei^{1,4#}, Xia Lei^{1,2,3#}, Liu Yongzhang^{1,3,4#}, Li Zhen^{1,3,4}, Wang Lu^{1,2,3}, Lü Bin^{1,2,3,4*}

(¹Institute of Biophysics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; ²Attardi Institute of Mitochondrial Biomedicine, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; ³Zhejiang Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou 325035, China;

⁴Department of Biology, School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract Human Lon protease is a homo-oligomeric ring-shaped ATP-dependent protease located in mitochondrial matrix. Recent researches demonstrated that Lon protease plays an important role in cellular homeostasis, mitochondrial protein quality control and metabolic regulation. Human Lon expression plasmid carrying a carboxyl-terminal hexahistidine tag was transformed into the *E.coli* Rosetta 2 strain and we optimized the induction condition for high expression. Ni²⁺-NTA agarose was used to purify this his-tag Lon protease. The peptidase activity of Lon was measured by using peptide substrate Rhodamine 110, bis-(CBZ-L-alanyl-L-alanine amide)[(Z-AA)2 Rh110], Casein and purified TFAM as substrates. The results showed that purified Lon retained the ATP-dependent enzymatic activity.

Key words mitochondria; Lon protease; protein purification; enzymatic activity

Received: April 26, 2012 Accepted: June 11, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31070710, No.31171345), Zhejiang Qianjiang Talent Project B grant (No.2010R10045), Wenzhou Medical College Foundation (No.QTJ09010), Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholar, State Education Ministry, Wenzhou Science & Technology Bureau (No.H20100064) and Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (No. Y2110097)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: 86-577-86699722; E-mail: lubmito@wzmc.edu.cn