

家蚕丙酮酸脱氢酶激酶基因的克隆与原核表达

宋海韬¹ 王力刚¹ 沈兴家^{1,2*} 黄勇¹ 赵巧玲^{1,2}

(1. 江苏科技大学, 江苏 镇江 212003; 2. 中国农业科学院 蚕业研究所、农业部蚕桑遗传改良重点开放实验室, 江苏 镇江 212018)

摘要: 丙酮酸脱氢酶激酶(PDK)在糖代谢的调控中具有重要作用,为了研究家蚕PDK(BmPDK)的功能,以蚁蚕总RNA为模板,应用RT-PCR技术扩增了BmPDK的cDNA,构建原核表达载体pET-28a-BmPDK进行表达和纯化。结果显示,克隆的BmPDK全长cDNA与NCBI公布的序列一致;Western blotting检测表明BmPDK蛋白得到了表达,且主要以包涵体形式存在;IPTG最佳诱导浓度为0.8 mmol/L,最佳诱导时间为8 h;2,6-二氯吡嗪法间接测定结果表明,纯化的BmPDK蛋白具有酶活性。

关键词: 家蚕; 丙酮酸脱氢酶激酶; 原核表达; 蛋白质免疫印迹; 酶活性

中图分类号: Q344+.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-8581(2011)10-0006-05

Cloning and Prokaryotic Expression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Gene in *Bombyx mori*

SONG Hai-tao¹, WANG Li-gang¹, SHEN Xing-jia^{1,2*}, HUANG Yong¹, ZHAO Qiao-ling^{1,2}

(1. Jiangsu University of Science & Technology, Zhenjiang 212003, China; 2. Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences; Key Opening Laboratory of Genetic Improvement of Silkworm and Mulberry, Ministry of Agriculture, Zhenjiang 212018, China)

Abstract: Pyruvate dehydrogenase kinases (PDK) played an important role in the regulation of sugar metabolism. To study the function of *Bombyx mori* PDK (*BmPDK*), the cDNA of *BmPDK* was amplified with RT-PCR method by using the total RNA of the newly-hatched silkworm larvae as template, and a prokaryotic expression plasmid pET-28a-BmPDK was constructed for expression and purification. The results showed that the cloned *BmPDK* cDNA was identical with that published in NCBI. Western blotting indicated *BmPDK* proteins have been successfully expressed, which existed mainly in the form of inclusion body. The best IPTG concentration and time for inducing the expression of *BmPDK* was 0.8 mmol/L and 8 hours, respectively. The purified *BmPDK* showed an enzyme activity when it was examined with the indirect method of 2,6-DCPIP.

Key words: *Bombyx mori*; Pyruvate dehydrogenase kinase; Prokaryotic expression; Western blotting; Enzyme activity

丙酮酸脱氢酶系(PDC)是一种复合酶,存在于线粒体中,它是催化丙酮酸氧化脱羧生成乙酰辅酶A的限速酶,使糖酵解与三羧酸循环与氧化磷酸化生成ATP的过程紧密地连接起来,在细胞线粒体呼吸链能量代谢中起关键作用^[1-4]。而丙酮酸脱氢酶激酶(PDK)是PDC的负调控酶,催化PDC磷酸化使其失活,在新陈代谢调节中起着极其重要的作用^[5-7]。家蚕丙酮酸脱氢酶激酶(*BmPDK*)的活性受葡萄糖代谢产物的影响,丙酮酸、NAD⁺以及辅酶A都能抑制*BmPDK*的活性,而乙酰辅酶A及NADH则能够增加*BmPDK*的活性^[8-9]。本文利用蛋白质双向电泳技术,研究了家蚕(*Bombyx mori*)二化性品种蚕卵在低温和常温催青条件下胚胎期蛋白质表达的差异,发现了一些差异表达蛋白点,其中包括*BmPDK*蛋白^[10]。为了进一步研究*BmPDK*的功能,本实验克隆了*BmPDK*基因cDNA序列,在生物信息学方法分析*BmPDK*蛋白的结构和分子进化的基础上,进行了原核表达。

1 材料与方法

1.1 蚕品种与主要试剂 家蚕二化性品种“秋丰”由本实验室提供。蚕卵用25℃光照催青,孵化当日上午收集0.1g蚁蚕作为实验材料,-70℃保存备用。

受体菌株BL21和表达菌株*E. coli* DH10B由本实验室提供。克隆载体为pMD-18T,表达载体为pET-28a。实验用主要试剂RNAiso Plus(Takara code: D9108A)、PrimeScriptTM RT reagents Kit (Perfect Real Time) (Takara code: DRR037A)以及SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time) (Takara code: DRR041A)均为Takara(大连)公司产品;SanPrep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒为上海生工产品;BCA试剂盒购自碧云天生物技术研究所;N-NTA层析柱为Qiagen产品;His-Tag抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)购自碧云天生物技术研究所;猪心丙酮酸脱氢酶复合体(PDHc)、丙酮酸钠、三磷酸腺苷二钠(ATP)、焦磷酸硫胺素(TPP)、氧化型辅

收稿日期: 2011-08-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. NSFC31072083)。

作者简介: 宋海韬(1983—)男,吉林长春人,硕士研究生,研究方向:分子生物学。* 通讯作者: 沈兴家。

酶 I (NAD⁺)、2,6-二氯吡啶酚(2,6-DCPIP)、蛋白质分子质量标准均为 Sigma 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 生物信息学分析 用 ProtParam 预测 BmPDK 蛋白质分子质量、等电点,SignalP 3.0 软件分析信号肽序列,TMHMM 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TM->

HMM-2.0/) 分析其功能域及跨膜结构,ProtScale 分析氨基酸序列的疏水性,NCBI 在线分析蛋白序列,Strap (<http://www.bioinformatics.org/strap/>) 分析蛋白质结构。从 NCBI GenBank 获得下列各物种的 PDK 氨基酸序列(表 1),用 MEGA 4.0 软件构建分子进化树。

表 1 实验用 19 个物种的 PDK 蛋白氨基酸序列的来源

物种名称	GenBank 登录号	物种名称	GenBank 登录号
家蚕(<i>Bombyx mori</i>)	NM_001114643.1	非洲爪蟾(<i>Xenopus laevis</i>)	NP_001085016.1
赤拟谷盗(<i>Tribolium castaneum</i>)	XP_973304.1	小鼠(<i>Mus musculus</i>)	NP_766253.2
丽蝇金小蜂(<i>Nasonia vitripennis</i>)	XP_001605707.1	大鼠(<i>Rattus norvegicus</i>)	NP_446278.2
蜜蜂(<i>Apis mellifera</i>)	XP_393904.2	大熊猫(<i>Ailuropoda melanoleuca</i>)	XP_002931060.1
埃及伊蚊(<i>Aedes aegypti</i>)	XP_001652720.1	斑马鱼(<i>Danio rerio</i>)	XP_683576.2
人体虱(<i>Pediculus humanus corporis</i>)	XP_002432162.1	牛(<i>Bos taurus</i>)	XP_607085.4
豌豆蚜虫(<i>Acyrtosiphon pisum</i>)	XP_001942904.1	人(<i>Homo sapiens</i>)	NP_002601.1
果蝇(<i>Drosophila melanogaster</i>)	NP_477215.1	文昌鱼(<i>Branchiostoma floridae</i>)	XP_002592098.1
致倦库蚊(<i>Culex quinquefasciatus</i>)	XP_001863651.1	红原鸡(<i>Gallus gallus</i>)	NP_001026523.2
肩突硬蜱(<i>Ixodes scapularis</i>)	XP_002415510.1		

1.2.2 引物设计与合成 根据家蚕 BmPDK 基因(GenBank 登录号: NM_001114643.1) ORF 序列,用 Primer5.0 软件设计 RT-PC 上游引物 F(5'-CCGGAATTCATGAGGTTAGCAGGAGCGATTTT-3') 和下游引物 R(5'-CCCAAGCTTTCATAGGCTGTGCGATATCGGTGATGAG-3') 5'端分别引入 EcoRI 和 HindIII 酶切位点(下划线部分),由上海生工合成。

1.2.3 BmPDK 基因的扩增 BmPDK 基因的扩增按照试剂盒说明书操作。用 RNAiso Plus 试剂盒抽提蚁蚕样品总 RNA; PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行 RT-PCR 反应,获得单链 cDNA; 用 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 试剂盒回收目的片段; 再用 LA PCR™ Kit Ver.2.1 试剂盒扩增目的基因全长 cDNA 反应条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,62 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,循环 30 次,最后 72 °C 延伸 10 min,取产物 4 μL 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 BmPDK 基因的克隆与序列测定 取 PCR 回收产物 0.5 μL、pMD-18-T 载体 4.5 μL、Solution I 5 μL,于 16 °C 反应 16 h。连接产物转化 DH10B 感受态细胞,均匀涂于含有氨苄青霉素(Amp)的 LB 平板中,挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中,37 °C 震荡过夜培养。用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒(上海生工产品)抽提质粒 DNA,用 EcoRI 和 HindIII 双酶切后经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,筛选阳性克隆 pMD-18T-PDK,寄上海生工测序鉴定。

1.2.5 BmPDK 基因重组表达载体的构建 用 EcoRI 和 HindIII 将 BmPDK 基因从测序鉴定正确的 pMD-18T-PDK 中切出,连接到用同样的酶(EcoRI 和 HindIII)消化的表达载体 pET-28a 大片段上,转化 E. coli BL21 感受态细胞,挑取单菌落接种于 3 mL LB 培养基中(含卡那霉素 Kan),37 °C 振荡培养过夜。用快速抽提法筛选重组

表达质粒 pET-28a-PDK 酶切鉴定其正确性。

1.2.6 BmPDK 蛋白的表达与纯化 取上述鉴定正确的重组质粒 pET-28a-PDK 培养物 100 μL,接种到 100 mL LB 培养基中,加入 200 μL Kan,37 °C 震荡培养 1.0~1.5 h,使菌液的 OD₆₀₀ 达到 0.5~0.7,加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导蛋白表达,37 °C 振荡培养过夜(10 h),离心收集菌体。用 500 μL 1×PBS 缓冲液重悬,超声波破碎(15 s,间隔 30 s,重复 10 次),离心收集上清和沉淀。

沉淀用洗涤液 I(50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,1.0 mol/L NaCl)重悬,-20 °C 保存 1 h,融化后离心;弃上清,沉淀用洗涤液 II(50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,1.7 mg/mL 溶菌酶、1.7 mmol/L EDTA)重悬,冰上孵育 30 min 后超声(超声 10 s,间隔 10 s,重复 6 次,冰上进行);向悬浮液中加入 20 mL Buffer-3(5% Triton-X100,50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,1 mmol/L EDTA),超声,37 °C 孵育 30 min,5000 r/min 离心 10 min,弃上清;重复 Buffer-3 步骤 2 次;沉淀用 10 mL Buffer-4(50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,1 mol/L 尿素,1 mmol/L EDTA)超声重悬,37 °C 孵育 30 min,离心;弃上清,沉淀溶于 5 mL 溶液 V(50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,8 mol/L 尿素,0.1 mol/L β-巯基乙醇,1 mmol/L EDTA)中,37 °C 孵育 1 h,离心去上清。

分别取培养物上清液和包涵体溶解液各 100 μL,加入 25 μL 5×蛋白上样缓冲液,100 °C 水浴 10 min,离心收集上清,SDS-PAGE 电泳,分析该菌株 BmPDK 蛋白的表达形式。按照 Ni-NTA 层析柱说明书纯化 BmPDK 蛋白。纯化后的原核表达蛋白溶液,在 4 °C 缓慢稀释入 Refold-Buffer(50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,1 mmol/L GSH,0.1 mmol/L GSSG,0.8 mol/L Arg),至终浓度约 10 μg/mL,静置 24 h。在蛋白透析液中透析,每 2 h 换一次

透析液 透析完成后用 PEG20000 浓缩纯化蛋白至约 1 mL 测定浓缩后的蛋白浓度 取适量用于 SDS-PAGE 与 Western Blot 分析。

SDS-PAGE 电泳时 配制 12% 的分离胶 (pH 8.8) 和 5% 的浓缩胶 (pH 6.8) 电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸 (pH 8.3)。上样 20 μ L 采用 8 V/cm 电压电泳 当溴酚兰进入分离胶后提高电压至 15 V/cm 电泳结束后用考马斯亮蓝 R250 染色约 1.5 h 加入脱色液 振荡过夜脱色。

Western blot 检测按照试剂盒说明书进行 一抗为兔抗 His-Tag 多克隆抗体 二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) 采用 DAB 显色液显色。

1.2.7 IPTG 诱导最适浓度和时间 按照上述方法进行另外一组实验 以确定 BmPDK 蛋白表达的 IPTG 诱导最佳浓度和最佳时间。取上述鉴定正确的重组质粒 pET-28a-PDK 培养物 分装于 6 支试管 每支 3 mL 分别加入终浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L 的 IPTG 以不加 IPTG 为对照 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 10 h 收集细胞 同样方法处理后进行 SDS-PAGE 电泳。

另取上述菌液分装 8 支试管 每支 3 mL 以上述实验确定的最适 IPTG 浓度 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 分别诱导 0、2、4、6、8、10 和 12 h 以不加 IPTG 作对照 收集细胞 同样方法处理后进行 SDS-PAGE 电泳。

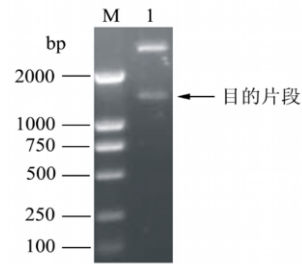
1.2.8 纯化蛋白 BmPDK 的酶活测定 以猪心丙酮酸脱氢酶复合体 (PDHc) 为底物 参照文献 [11-12] 的方法 采用 2,6-二氯吡嗪酚法间接测定 BmPDK 蛋白的酶活性 具体步骤如下: 将猪心丙酮酸脱氢酶复合体 (PDHc) 用 50 mmol/L (pH 7.1) 磷酸钾盐缓冲液 (含 20% 的甘油) 稀释至 0.25 U/mL; 在 4 管 1 mL 的反应体系 (50 mmol/L 磷酸钾盐缓冲液 1 mmol/L $MgCl_2$ 0.2 mmol/L TTP 0.1 mmol/L 2,6-DCPIP 和 2.0 mmol/L 丙酮酸钠) 中加入 20 μ L PDHc。第 1~3 管加入终浓度为 0.1 mg/mL 的 BmPDK 纯化复性蛋白 并加入 1 mmol/L ATP μ L 激活 BmPDK 分别在反应 0、1.3 和 5 min 后加入 1 mmol/L NAD^+ 终止反应 分光光度计 (Ultraspec 3300pro GE 公司产品) 测定并计算各管的 OD_{600} 值 反应 0 min 时的 OD_{600} 值记为 A_0 、反应 t min 时的 OD_{600} 值为 A_t ; 第 4 管加入 PDHc 直接测定 OD_{600} 的值作为空白对照 试验设 3 次重复。计算公式: $\Delta OD_{600}/min = (A_t - A_0) / \Delta t$ $A_t = A_0 e^{-kt}$ 式中 e 为自然对数底 k 为表观一级反应常数 BmPDK 的活性用 k 表示。

2 结果与分析

2.1 BmPDK 基因的克隆与序列分析

2.1.1 重组质粒 pMD-18T-PDK 酶切鉴定和测序 抽提 pMD-18T-PDK 质粒 DNA 经 *Eco*RI 和 *Hind*III 双酶后电泳鉴定 可见约 1200 bp 的条带 与预期片段大小一致 (图 1)。测序后获得一条 1254 bp 的序列 经与 NC-

BI 公布的 *BmPDK* 基因 cDNA 序列 (登录号: NM_001114643.1) 比对 完全一致 说明克隆序列正确。



M: DL 2000 marker 1: 重组质粒 pMD-18T-PDK 酶切产物

图 1 重组质粒 pMD-18T-PDK 酶切产物电泳图

2.1.2 *BmPDK* 基因生物信息学分析 生物信息学分析显示 *BmPDK* 基因 ORF 全长 1254 bp 编码 417 个氨基酸残基。蛋白质分子质量为 46.92 kDa pI 为 6.61。蛋白一级序列中未发现信号肽序列 第 24~195 氨基酸残基为一个线粒体支链 α -酮酸脱氢酶激酶序列; 第 246~360 氨基酸残基为一个类组氨酸激酶序列 含有一个 ATP 结合位点、一个 Mg^{2+} 结合位点和一个 G-X-G 模体 未发现跨膜结构。

PDK 氨基酸序列在昆虫中相当保守 *BmPDK* 与丽蝇蛹集金小蜂、埃及伊蚊、赤拟谷盗、果蝇和蜜蜂等昆虫 PDK 氨基酸序列的相似性分别达到 71.8%、71.6%、71.4%、67.7% 和 67.6%。用 MEGA 4.0 软件构建的基于 19 种不同物种 PDK 氨基酸序列的分子进化树显示 19 个物种聚为 A 群和 B 群 A 群为昆虫 B 群为脊椎动物。在 A 群中 家蚕与其它 9 种昆虫聚为一个亚群 肩突硬蜱单独构成一个亚群 (图 2)。说明在这些物种中 家蚕与果蝇、埃及伊蚊和致倦库蚊等昆虫亲缘关系较近 与其它昆虫的亲缘关系较远 与脊椎动物亲缘关系更远。

2.2 *BmPDK* 基因重组表达载体的构建与表达 抽提 pET-28a-PDK 重组表达质粒 DNA 经 *Eco*RI 和 *Hind*III 双酶切鉴定 可见约 1200 bp 的目的基因 *BmPDK* 条带 以及 pET-28a 酶切大片段 (图 3) 说明表达质粒构建成功。

将表达菌株用终浓度 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 10 h 收集上清液和菌体 分别处理后进行 SDS-PAGE 电泳 [11]。结果显示 上清液中无明显表达带 沉淀部分在 47 kDa 处有明显特异蛋白表达带 说明 *BmPDK* 蛋白成功表达 且该蛋白主要以包涵体形式存在 (图 4)。

2.3 IPTG 诱导表达的优化 将 IPTG 加入重组表达菌株培养基中 使终浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L 以不加 IPTG 的培养物为对照 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 10 h 收集菌体进行 SDS-PAGE 电泳。结果显示 IPTG 各种浓度诱导后 *BmPDK* 均有表达 其中以 0.8 mmol/L 条带最亮 (图 5) 表明此浓度下 *BmPDK* 表达量最大。

根据上述试验确定的 IPTG 最佳浓度 (0.8 mmol/L) 重组表达菌株培养基中加入 IPTG 后继续在 37 $^{\circ}$ C 振

荡培养 2、4、6、8、10 和 12 h ,以不加 IPTG 诱导的培养物为对照 收集菌体进行 SDS - PAGE 电泳。结果显示 培

养 8 h 蛋白质目的条带最亮 ,说明 BmPDK 蛋白经 IPTG 诱导 8 h 表达量最大(图 6)。

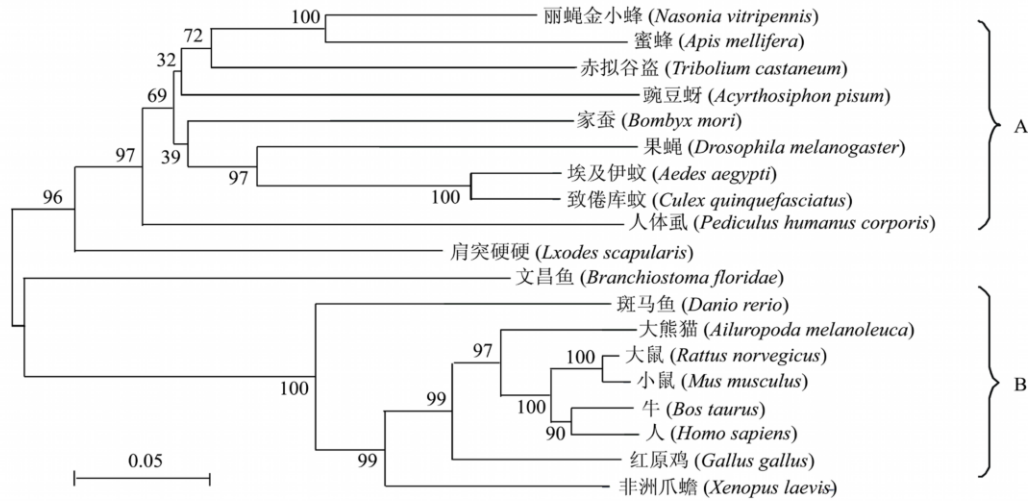
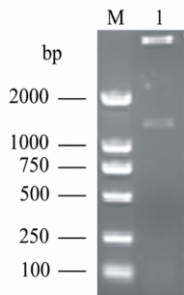
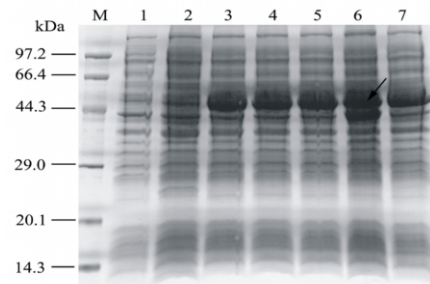


图 2 BmPDK 与其它昆虫同源蛋白序列的系统发生树



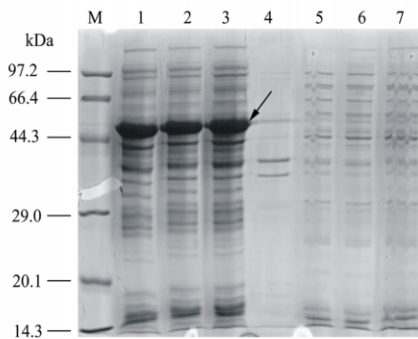
M: DL 2000 marker; 1: pET - 28a - BmPDK 质粒酶切产物

图 3 pET - 28a - BmPDK 质粒酶切产物电泳图



M: Marker; 1: 空白细菌; 2: 对照(无 IPTG); 3 ~ 7: 分别为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L IPTG 诱导

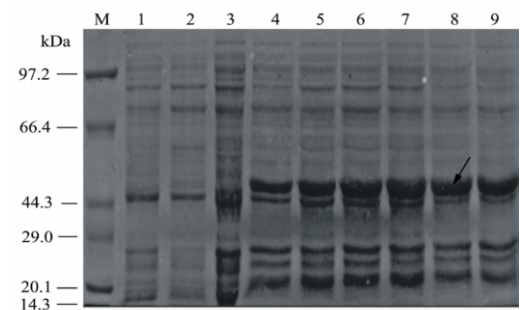
图 5 BmPDK 蛋白表达最适 IPTG 诱导浓度



M: Marker; 1 ~ 3: 沉淀; 4: 空白; 5 ~ 7: 上清液

图 4 目的蛋白 BmPDK 的表达

2.4 Western blot 将 BmPDK 蛋白的表达菌株进行大量培养 ,OD₆₀₀ = 0.5 ~ 0.7 时 加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG 37 °C 振荡培养 8 h 收集菌体 用 Ni - NTA 柱纯化蛋白 SDS - PAGE 电泳后进行 Western blot ,以培养物上清作对照。结果显示 ,上清液中没有明显的目的蛋白条带; 未经 Ni - NTA 柱纯化的沉淀中目的条带清晰 ,但有明显的杂带; 经 Ni - NTA 柱纯化后的蛋白只有一条目的蛋白带 ,说明成功构建原核表达载体 pET - 28a - PDK ,BmPDK 蛋白得到表达(图 7)。



M: Marker; 1 ~ 2: 空白; 3: 对照; 4 ~ 9: 分别用 IPTG 诱导表达 2、4、6、8、10 和 12 h

图 6 BmPDK 表达最适 IPTG 诱导时间

2.5 BmPDK 酶活测定

2.5.1 BmPDK 蛋白浓度 将 BCA 试剂盒(碧云天公司产品) 的标准蛋白稀释成梯度浓度 测 OD₅₆₂ 建立标准曲线。取 4 μL 纯化 BmPDK 蛋白 ,用同样方法测 OD₅₆₂ = 0.376 经计算纯化 BmPDK 蛋白浓度为 0.96 mg/mL。

2.5.2 纯化 BmPDK 蛋白的活性 采用 2,6 - 二氯吡嗪酚法间接测定。将 BmPDK 激活后测定各反应时间的

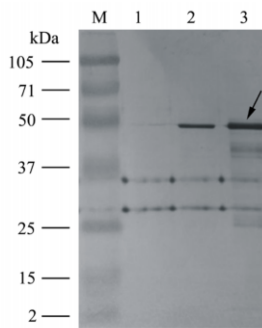
PDC 的 OD_{600} 计算 $\Delta OD_{600}/min$ 结果如表 2。经计算表观一级反应速率常数 $k = 0.062$, 说明表达的 BmPDK 蛋白有一定的活性(图 8)。

3 讨论

本实验成功克隆了 BmPDK 基因全长 cDNA 序列, 利用生物信息学方法对蛋白结构和基因系统进化进行了初步分析, 构建了原核表达载体, 成功表达了该蛋白, 为后续基因功能分析打下了基础。

表 2 分离纯化的 BmPDK 蛋白酶活测定

反应时间/min	0(A ₀)	1(A ₁)	3(A ₃)	5(A ₅)
OD_{600}	0.103 ± 0.034	0.091 ± 0.025	0.083 ± 0.031	0.071 ± 0.017



M: Marker; 1: 培养物上清; 2: Ni-NTA 柱纯化蛋白; 3: 培养物沉淀(未纯化)

图 7 BmPDK 蛋白的 Western blot 检测

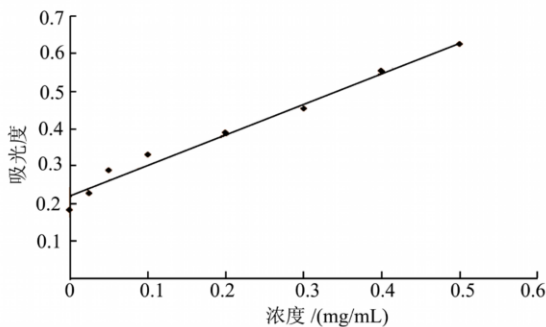


图 8 BCA 法蛋白标准曲线

由于 PDK 的反应底物 PDC 是一种酶, 没有可以直接显色的检测方式, 所以本实验通过测定 PDC 活性间接测定纯化 BmPDK 的酶活性。测定 PDC 活性的方法有放射性同位素标记法和分光光度法。同位素标记法没有分光光度法便利, 且易造成环境污染; 分光光度法有 CoA 法、碘硝基四唑紫法、铁氰化钾法和 2,6-二氯吡啶酚法, 其中 CoA 法的试剂成本太高, 碘硝基四唑紫法本底吸收较大, 铁氰化钾法灵敏度极低, 2,6-二氯吡啶酚法则灵敏度较高, 所以本实验采用 2,6-二氯吡啶酚法间接测得 BmPDK 的活性^[12]。2,6-二氯吡啶酚法的原理

是 PDC 复合体中的 E1 能使 TPP 转化为羟乙基-TPP, 羟乙基-TPP 则能还原 2,6-二氯吡啶酚, 从而减少 600 nm 处的光吸收^[13]。本实验结果显示, 纯化 BmPDK 蛋白的表观一级反应速率常数 $k = 0.062$, 说明纯化的 BmPDK 蛋白有一定的活性。但是, 纯化产物的活性很低, 可能是由于蛋白纯化过程中部分失活, 或包涵体蛋白复性效果欠佳, 需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Wende A R, Huss J M, Schaeffer P J, et al. PGC-1 α coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERR α : a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(24): 10684-10694.
- [2] Kim Y I, Lee F N, Choi W S, et al. Insulin regulation of skeletal muscle PDK4 mRNA expression is impaired in acute insulin resistant states[J]. Diabetes, 2006, 55(8): 2311-2317.
- [3] Kwon H S, Harris R A. Mechanisms responsible for regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 gene expression[J]. Adv Enzyme Regul, 2004, 44: 109-121.
- [4] Tuganova A, Klyuyeva A, Popov K M. Recognition of the inner lipoyl-bearing domain of dihydrolipoyl transacetylase and of the blood glucose lowering compound AZD7545 by pyruvate dehydrogenase kinase 2[J]. Biochemistry, 2007, 46(29): 8592-8602.
- [5] Kolobova E, Tuganova A, Boulatnikov I, et al. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites[J]. Biochem J, 2001, 358(1): 69-77.
- [6] 杨卓刚, 刘晓晴. 高等生物丙酮酸脱氢酶复合体活性调节机制[J]. 生命的化学, 2008, 28(3): 304-306.
- [7] 李凤艳, 刘晓晴. 哺乳动物中丙酮酸脱氢酶复合体的活性调节[J]. 生物技术通报, 2006(1): 9-12.
- [8] Sumedha R, Jhuma D, Samita K, et al. Estradiol-17 β : Tracing its metabolic significance in female fat body of fifth instar larvae of silkworm *Bombyx mori* L. (race: Nistari) [J]. Life Sci, 2007, 80: 446-453.
- [9] 赵林川, 时连根. 家蚕滞育卵中辅酶I和辅酶II的含量变化[J]. 蚕业科学, 2008, 34(3): 447-452.
- [10] 章扬, 裘智勇, 赵巧玲, 等. 二化性家蚕卵低温和高温催青的胚胎期蛋白质表达差异分析[J]. 蚕业科学, 2010, 36(3): 413-420.
- [11] 孙辉, 刘朝良. 柞蚕雌蛾粘液腺内容物中 56kD 蛋白的初步分离与纯化[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(23): 14156-14157.
- [12] 何亚辉, 姜英, 袁均林, 等. 丙酮酸脱氢酶测定方法比较研究[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(8): 27-30.
- [13] Nemeria N, Yan Yan, Zhen Zhang, et al. Inhibition of the Escherichia coli Pyruvate Dehydrogenase Complex E1 Subunit and Its Tyrosine 177 Variants by Thiamin 2-Thiazolone and Thiamin 2-Thiothiazolone Diphosphates [J]. Biol Chem, 2001, 276(49): 45969-45978.