

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (11):1241–1247; 4 November 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.11.001

革兰氏阴性细菌 β -桶状结构外膜蛋白体外折叠的研究进展

代先祝, 邵娜娜, 罗峰*

西南大学资源环境学院生物能源与环境修复研究中心, 重庆 400715

摘要:除了细胞质膜, 革兰氏阴性细菌细胞还有一层组成细胞壁的外膜 (Outer Membrane)。膜蛋白是外膜的主要组成成分之一, 绝大多数外膜蛋白是由反向平行的 β -折叠 (β -Strands) 通过相邻的氢键结合形成的 β -桶状结构蛋白 (β -Barrel Proteins)。这些蛋白既可作为通道蛋白、转运蛋白、酶、受体、毒力因子, 也可作为结构蛋白发挥稳定外膜的重要作用, 它们是否正确折叠并整合到外膜对革兰氏阴性细菌的生存至关重要。大多数外膜蛋白易于重组表达和体外重折叠 (*in vitro* refolding), 并且折叠状态可通过多种方法测定, 因此 β -桶状结构外膜蛋白被当着模式蛋白来研究各类生物和非生物因子对膜蛋白折叠的影响, 是膜蛋白研究的一大热点。本文将从 β -桶状结构外膜蛋白体外折叠的研究方法和影响折叠的因素角度对近年相关研究进展进行综述, 最后总结了外膜蛋白体外折叠模式, 并结合作者的相关研究结果和观点对该领域的研究前景进行了展望。

关键词: β -桶状结构外膜蛋白, 体外重折叠, 折叠效率

中图分类号: Q936 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 11-1241-07

革兰氏阴性细菌细胞壁组成和结构比革兰氏阳性细菌更为复杂, 除了较薄的肽聚糖层还有外膜层 (Outer Membrane)。外膜层是革兰氏阴性细菌的一个重要保护屏障, 可阻挡大分子物质自由出入细胞, 由外层脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 和内层磷脂组成的双分子膜及镶嵌其中的膜蛋白组成。目前研究的外膜蛋白几乎都具有 β -桶状结构 (β -Barrel), 通常直接将它们称为外膜蛋白 (Outer Membrane Proteins, OMPs)。OMPs 是由反向平行的 β -折叠 (β -strands) 通过相邻的氢键连接形成的 β -桶状结构, 具有面向脂膜内部的疏水性面和面向桶

状结构内部的亲水性面, 各 β -折叠之间由伸向胞外的长环 (Long Loops) 和面向周质空间的短环 (Short Loops) 连接, β -折叠数一般为偶数 (图 1)^[1]。除了跨膜的 β -桶状结构域, 有的 OMPs 还有周质空间可溶性结构域, 如大肠杆菌的 OmpA 及其同源蛋白^[2]。

OMPs 在革兰氏阴性细菌的物质运输、保证外膜完整性、病原菌致病性及多重耐药性等方面发挥着至关重要的作用, 因此详细了解这些蛋白生物合成过程在抵抗病原菌和充分利用有益微生物等方面具有重要意义。但胞内 (*in vivo*) 研究这一过程的难

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41301263); 中央高校基本科研业务费专项资金 (XDJK2012C033, SWU112018)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-23-68250109; E-mail: vanlott@hotmail.com

作者简介: 代先祝 (1978 -), 女, 四川安岳人, 副教授, 博士, 主要从事低温微生物的低温适应机理及其应用研究。E-mail: daixianzhu@126.com

收稿日期: 2014-02-18; **修回日期:** 2014-04-30

度很大,目前对 OMPs 的折叠与膜整合过程及其影响因素还所知甚少。所幸多数 OMPs 易于体外重组表达和重折叠 (Refolding), 其折叠状态和折叠动力学可通过多种方法测定, 因此重折叠 OMPs 是了解各类生物和非生物因子对膜蛋白折叠影响的重要途径, 也是获得膜蛋白晶体的主要方法^[3]。另外, 具

有通道蛋白功能的 OMPs 体外折叠后因其良好的稳定性还是很好的纳米孔生物材料^[4]。这些因素使得 OMPs 体外折叠成为外膜蛋白研究的一大热点, 本文将结合作者的相关研究结果和观点对 OMPs 体外折叠的研究进展进行综述。

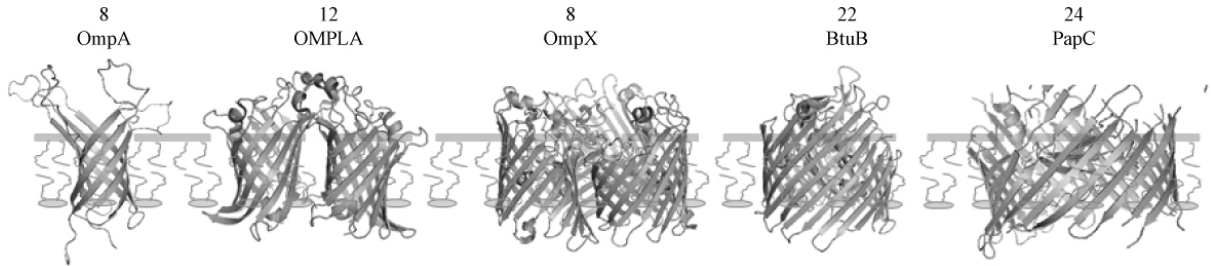


图 1. 几种代表性的 OMPs 结构图 (图中数字代表 β -折叠的数量)^[1]

Figure 1. Some representative structures Of OMPs (The numbers indicate the number of β -strands)^[1].

1 OMPs 体外折叠研究方法

1.1 体外重组表达与纯化

OMP 的 N-末端有将其定位到细胞内膜并经过内膜的 Sec 系统 (Secretory Translocation System) 转运到周质空间的信号肽序列, 转运的同时被信号肽酶切除信号肽并释放到周质空间, 非折叠状态的 OMPs 通过周质空间的分子伴侣 DegP/Skp 或 SurA 转运系统到达外膜的内侧进行折叠和组装^[5-6]。在进行重组表达时, 如果保留 N-末端信号肽序列并选择合适的表达宿主, 所表达的 OMPs 会被转运到外膜, 正确折叠和整合到外膜上。但大量 OMPs 整合到外膜中会影响外膜结构的稳定性和完整性, 对细菌细胞造成损伤, 影响其生长, 甚至导致宿主细胞裂解死亡, 因此采用这一种重组表达方式表达不易获得大量的 OMPs。去除 N-末端信号肽的 OMPs 基因序列克隆到高效表达载体进行大量表达时, 会在宿主细胞质内累积^[7-8], 由于 OMPs 具有疏水性, 累积的蛋白形成包涵体 (Inclusion Body), 不会影响宿主细胞的生长, 容易获得大量重组表达的 OMPs。通过简单的差别离心分离包涵体, 然后用一定浓度的变性剂或较低浓度的表面活性剂洗涤的方法就可以获得较高纯度的 OMPs。洗涤后的 OMPs 用变性剂或强离子型表面活性剂去折叠, 然后可通过常规的蛋白质纯化方法进行纯化以获得更高纯度的蛋白用于重折叠、结晶等, 但在纯化过程中需要使用变性剂

或表面活性剂保持其可溶性, 如尿素、盐酸胍、和 N-月桂酰肌氨酸钠盐等^[9]。

1.2 折叠介质

如上文所述, OMPs 具有两性结构, 重折叠时需要能提供疏水和亲水双相环境的介质。革兰氏阴性细菌的外膜是由外层的 LPS 和内层磷脂组成的非对称双分子膜, 要在体外用 LPS 和磷脂制备这样的非对称双分子膜非常困难, 而且这一类非对称膜稳定性一般也很差, 因此一般都是用其它能提供双极性环境的介质, 如磷脂和较柔和的表面活性剂等来代替^[10]。由磷脂在水溶液中形成的脂质体 (Liposome) 的脂双分子层 (Lipid bilayer) 和表面活性剂形成的胶束 (Micelle) 都可以为 OMPs 提供同时具备疏水和亲水的双相折叠环境。其它一些两性分子, 如两性助溶剂 2-甲基-2,4-戊二醇也被用来作为 OMP 的折叠介质^[11]。

1.3 折叠状态检测方法

1.3.1 SDS-PAGE: 大多数 OMPs 具有热修饰性 (Heat modifiability), 即溶于含 SDS 电泳上样缓冲液中的 OMPs 经加热 ($>95\text{ }^{\circ}\text{C}$) 再进行 SDS-PAGE 电泳时, 其在凝胶中的泳动速度明显较不加热样品减慢, 这一特性常用来判断 OMPs 是否正确折叠^[1, 12-14]。热修饰性的具体原因并不清楚, 可能由于 OMPs 外层疏水的 β -桶状结构在不加热情况下对 SDS 变性作用具有抵抗性, 保持了其紧密的结构, 而加热后蛋白结构变得疏散, 因此在凝胶中的泳动速度变慢。SDS 可以中断 OMPs 在脂质体中的体外折

叠,故还可以用 SDS-PAGE 对 OMPs 进行折叠动力学分析^[1]。

1.3.2 色氨酸荧光光谱:芳香族氨基酸常存在于跨膜蛋白的脂-水界面,在稳定膜蛋白结构上发挥重要的作用,芳香族氨基酸与脂膜的疏水相互作用还对膜蛋白折叠和膜插入有促进作用^[16]。色氨酸的荧光对其所在的微环境非常敏感,当蛋白质中的色氨酸残基处于极性微环境时,其发射荧光谱在 350 nm 附近形成一个峰,当色氨酸残基周围的微环境非极性变强时,其荧光谱的峰会蓝移至 330 nm 处,且荧光强度大幅度增加。在 OMPs 的脂-水界面处一般存在数个色氨酸残基,可以作为检测 OMPs 构像变化、折叠动力学及其与脂膜相互作用的内在荧光探针^[17]。

除了直接利用 OMPs 的色氨酸荧光探针,还可以结合荧光猝灭 (Fluorescence Quenching) 和其它光谱技术来研究 OMPs 折叠过程中的一些细节。例如, OmpA 有 5 个色氨酸,都位于面向胞外或面向周质空间的脂-水界面处, Kleinschmidt JH 等使用添加了烷基链的 6,7-C、9,10-C 和 11,12-C 被溴化的磷脂制备脂质体,体外折叠 OmpA 的色氨酸单突变体,利用溴对色氨酸荧光的猝灭作用检测 OmpA 折叠过程中在磷脂双分子层中的移动情况及其折叠中间体的形成,这种方法被称为实时荧光猝灭距离测定技术^[18]。他们还在 OmpA 单色氨酸突变体中各色氨酸相邻 β -折叠对应位置进行单半胱氨酸突变,并以荧光猝灭物硝酰基自旋标记 (Nitroxyl Spin Label) 修饰半胱氨酸,利用低温减缓 OmpA 的折叠速率,通过测定荧光猝灭程度发现折叠和膜整合的同时 OmpA 的各相邻 β -折叠在不同的时间段相互靠近^[19]。色氨酸荧光还被用于研究 OMPs 与分子伴侣之间的相互作用,如证明分子伴侣 Skp 通过疏水作用与非折叠状态的 OmpA 膜整合结构域结合,而不与其周质空间结构域结合^[20]。我们也曾利用色氨酸荧光光谱比较和外加丙烯酰胺后荧光猝灭速率的差异证实了含二十碳五烯酸的磷脂会改变 *Shewanella livingstonensis* Ac10 外膜蛋白 Omp74 的结构(未发表数据)。

1.3.3 圆二色谱 (Circular Dichroism Spectra, CD):不同二级结构的蛋白具有各自特征性的圆二色谱,反向平行的 β -折叠在 218 nm 处有 1 个负吸收峰,在 195 nm 处有 1 个正吸收峰,而处于无序结

构的蛋白的圆二色谱信号非常弱^[21]。因此常用 CD 确认 OMPs 从被变性剂完全去折叠的状态到形成 β -折叠的变化,还可选择特定波长测定 OMPs 折叠动态,如 Surrey T 等根据 CD 信号的变化推断出 OmpA 在变性剂稀释的瞬间 (<1 s) 即可产生丰富的 β -折叠二级结构^[12]。我们在低温下用 215 nm 的 CD 测定了 Omp74 的折叠动力学过程,发现在水溶液中形成的 β -折叠在后期的折叠和膜整合过程中有一个重新调整的过程,并发现含二十碳五烯酸的磷脂对 Omp74 的 β -折叠形成具有促进作用^[7]。

1.3.4 其它方法:除了上述 3 种常用方法,傅里叶共振能量转移、紫外共振拉曼光谱、核磁共振、计算机模拟和原子显微镜等技术也被用于研究 OMPs 的折叠过程及其与磷脂或分子伴侣的特异性相互作用^[16, 22-27],这些研究技术的利用为 OMPs 折叠提供了很多其它方法难以获得的信息,如 Kang G 等用傅里叶共振能量转移研究发现 OmpA 在膜整合前和整合过程中形成内部孔径较窄的 β -桶状结构,整合后经过一个较长时间的自身平衡过程后孔径变大^[23]。另外电导、渗透膨胀和酶活性检测等还用于研究具有特定功能的 OMPs^[2]。

2 外膜蛋白体外折叠过程

综合已有的关于 OMPs 体外折叠相关报道及我们的研究结果,以折叠介质为脂质体为例,可以将 OMPs 的体外折叠过程概括为以下几步(图 2):(1) 疏水塌缩 (Hydrophobic Collapse),存在于高浓度的变性剂(如 8 mol/L 的尿素)中的 OMPs 处于一种完全去折叠状态,没有固定的二级结构,在稀释变性剂的瞬间, OMPs 发生疏水坍塌,形成一定含量的 β -折叠二级结构;(2) 磷脂膜表面吸附,疏水坍塌后的 OMPs 吸附到磷脂双分子膜表面;(3) 二级结构重组,疏水坍塌形成的二级结构与 OMPs 的跨膜结构存在较大的差异,因此在膜吸附后需要对二级结构进行调整为下一步折叠做好准备;我们在用 CD 监测 Omp74 体外折叠过程中观察到这一调整过程,表现为 β -折叠含量在此过程中先降低后增加, Kleinschmidt JH 等也观察到 OmpA 在吸附到脂膜表面后存在这一过程,且该过程与脂膜的性状有关,存在凹凸状表面构造的脂膜能促进该过程的发生^[19],这与我们发现的含多聚不饱和脂肪酸的磷脂有助于

二级结构形成的结论一致; (4) 膜插入与折叠, 经过二级结构重组, OMPs 插入磷脂双分子膜中, 同时形成 β -桶状结构, 这一过程是 OMPs 体外折叠的限速

步骤, 磷脂的烃基链组成和特性对这一步骤的影响很大; (5) 跨膜与膜内平衡, 跨膜后经过与磷脂相互作用与自身平衡, 完成折叠。

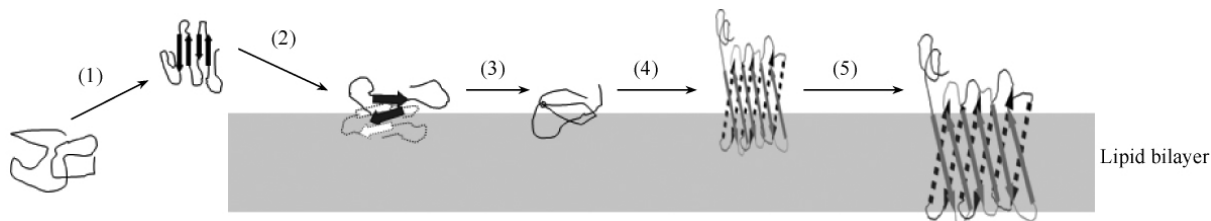


图 2. OMPs 以脂质体为介质的体外重折叠过程^[19]

Figure 2. *In vitro* refolding process of OMPs into the lipid bilayer of liposomes^[19].

3 影响 OMPs 体外折叠的因素

3.1 折叠介质对折叠的影响

磷脂双分子层是膜整合蛋白存在的介质环境, 两者之间的特异性或非特异性相互作用可能影响膜蛋白的折叠组装及构象。OMP 的体外折叠动力学研究表明, 磷脂浓度、磷脂的酰基链长度、磷脂的亲水性头部结构和电荷、磷脂的酰基链饱和程度 (即磷脂双分子层的流动性) 和脂质体大小等因素都会影响 OMP 的体外折叠效率^[1, 2, 13, 15, 28]。

以表面活性剂为折叠介质对 OMP 体外折叠时, SDS、N-月桂酰肌氨酸钠盐等强阴离子表面活性剂一般不支持 OMP 的体外折叠, 可能由于这一类表面活性剂强负电荷的亲水性头部与 OMP 带负电荷的氨基酸残基相互排斥阻碍了 OMP 折叠到胶束的疏水核。十二烷基麦芽糖苷、n-辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷和 SB3-14 等中性和双离子性表面活性剂一般支持 OMP 的折叠^[29]。

3.2 pH 值的影响

OMP 都在偏碱性条件下折叠效率更高, 但 pH > 10 时折叠效率又会下降^[12]。分析其原因可能是 OMP 的 pI 值大多在 6 左右, 在 pH < 10 的碱性条件下蛋白表面的负电荷增强, 有利于阻止蛋白聚集沉淀, 使得蛋白折叠效率提高, 而当 pH 值进一步增加, OMP 的精氨酸残基被去质子化, 蛋白表面的负电荷过强, 电荷间的排斥力反而阻碍蛋白的折叠^[15]。pH 值的改变还可以导致某些 OMP 构象发生微小的变化, 从而调节其亲水通道的开和闭^[30-31]。

3.3 温度的影响

在不影响折叠介质的特性的前提条件下, 大多

数 OMP 在较高的温度时折叠效率更高, 但也有一部分 OMP 表现出相反的行为, 在高温下折叠效率反而降低了^[1]。温度除了影响 OMP 折叠效率, 也可调节一些 OMP 的结构变化, 如 OmpA 和 OprF 在 < 37 °C 条件下折叠形成电导率低的慢性通道结构, 而在温度 > 37 °C 时折叠成电导率高的结构^[13]。

3.4 分子伴侣及 BAM (β -barrel assemble machinery) 蛋白复合体对体外重折叠的影响

OMP 在细胞质中合成, 经过 Sec 系统转运到周质空间后, 再通过分子伴侣 DegP/Skp 或 SurA 转运系统到达外膜的内侧进行折叠和组装^[5-6]。分子伴侣最后将 OMP 传递给折叠组装辅助因子 BAM 进行折叠, BAM 复合体由 5 种单体组成, 分别被命名为: BamABCDE, 其中 BamA 和 BamD 是关键组成^[32]。

分子伴侣 Skp 结合未折叠状态的 OmpA, 它可防止 OmpA 过早聚集沉淀, 并可利用自身的正电荷促进 OmpA 定位到带负电荷脂膜表面, 提高膜整合和折叠效率^[33]。用脂质体对 PagP 进行的体外折叠研究结果也表明, Skp 能阻止其在亲水溶液中的聚集沉淀, 而它是否促进 PagP 折叠还受磷脂酸的组成和折叠缓冲液离子强度的影响^[17]。与 Skp 结合的 OmpX 结构与化学试剂变性的 OmpX 结构类似, 进一步证明了分子伴侣有防止 OMP 沉淀的功能^[26]。

Hagan CL 等纯化了 BAM 复合体, 研究其对外膜蛋白酶 OmpT 的体外折叠效率的影响, 结果显示只有当 BAM 复合体的所有单体都存在时 OmpT 的折叠效率最高, 并且折叠体系中还需要添加分子伴侣 SurA 将 OmpT 转运到膜上进行折叠^[34]。整合在脂质体中的 BamA 能促进与分子伴侣 Skp 结合的 OmpA 体外折叠, 而且能消除磷脂酰乙醇胺对 OmpA

折叠的抑制作用^[35]。

体外折叠研究还发现 OmpA 的可溶性结构域在其折叠过程中扮演着分子伴侣的角色, 通过降低蛋白的 β -桶状结构域聚集沉淀来提高其体外折叠效率, 当采用大分子物质模拟胞内的 crowding 条件进行折叠时, 这种效应更为显著^[36-37]。

4 外膜蛋白体外折叠的研究前景

蛋白质只有正确折叠成其特定的天然结构才能执行正确的生物学功能, 了解蛋白质的折叠机理不仅具有重要的科学意义, 而且在医学及生物工程领域具有极大的应用价值。OMP 是蛋白折叠研究领域一个非常有研究前景的模型, 其易于表达和重折叠的特性可用于膜蛋白折叠动力学、稳定性、与磷脂的相互作用及环境影响因素研究。虽然体外折叠与胞内折叠存在很多差异, 但是通过体外折叠获得的很多信息能用于推测胞内 OMP 的折叠过程及影响因素。在线粒体中也有 OMPs, 折叠全过程的了解还可增强对膜蛋白折叠错误和变性的认识, 从而理解某些疾病的发生和病原菌的致病机理。OMP 结构具有良好稳定性与均一性, 因此是纳米孔的良好材料, 可用于传感技术。

关于外膜蛋白的折叠、膜整合及与磷脂的相互作用研究近年来已经取得诸多进展, 但是仍然有很多空白有待探索: (1) 最近 Nicholas N 等获得了 BamA 的晶体结构, 发现其跨膜的 β -桶状结构面向磷脂双分子层处存在可开合的缺口^[38], 这是关于外膜蛋白折叠研究的重大突破, 但还需要验证这一缺口是否在 BamA 协助其它外膜蛋白折叠过程中起到向磷脂膜释放折叠后的 OMPs 的功能, 而体内研究很难进行这样的验证, 需要通过体外折叠体系来进行; (2) OMPs 折叠过程中, 其面向胞外的亲水性长环是如何跨过疏水的磷脂双分子层也是很有意思的课题; (3) OMPs 的体外折叠动力学很大程度上受磷脂双分子膜的特性影响, 反过来磷脂膜的特性本身除了磷脂组成外还受膜周蛋白、膜镶嵌蛋白影响, 因此研究分子伴侣、BAM 复合体的各组分和其它各种周质空间蛋白与磷脂间的相互作用及其对 OMPs 折叠的影响非常重要; (4) 膜蛋白中一些特殊氨基酸在外膜蛋白折叠中的作用也是体外折叠研究的一个重要方向, 如上文提到的色氨酸。我们对 Omp74 的

6 个色氨酸单突变体的体外折叠研究发现, 位于胞外长环上的一个色氨酸单突变体在以脂质体为折叠介质时折叠效率急剧下降, 但在以表面活性剂为折叠介质时折叠效率却没有变化, 说明外膜蛋白上不同位置的色氨酸在折叠过程中还存在协同作用, 而且这种协同作用可能需要磷脂分子的参与 (未发表数据)。总之, 体外折叠研究是解开革兰氏阴性细菌、叶绿体和线粒体的外膜蛋白折叠过程不可缺少的途径之一, 还有待进一步开展更多的相关研究。

参考文献

- [1] Burgess NK, Dao TP, Stanley AM, Fleming KG. β -barrel proteins that reside in the *Escherichia coli* outer membrane *in vivo* demonstrate varied folding behavior *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283 (39) : 26748-26758.
- [2] Kleinschmidt JH. Membrane protein folding on the example of outer membrane protein A of *Escherichia coli*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003, 60 (8) : 1547-1558.
- [3] Saleem M, Prince SM, Patel H, Chan H, Feavers IM, Derrick JP. Refolding, purification and crystallization of the FrpB outer membrane iron transporter from *Neisseria meningitidis*. *Acta Crystallographica Section F*, 2012, 68 : 231-235.
- [4] Mohammad MM, Iyer R, Howard KR, McPike MP, Borer PN, Movileanu L. Engineering a rigid protein tunnel for biomolecular detection. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134 (22) : 9521-9531.
- [5] Randall LL, Crane JM, Lilly AA, Liu GP, Mao CF, Patel CN, Hardy SJS. Asymmetric binding between SecA and SecE two symmetric proteins: Implications for function in export. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 348 (2) : 479-489.
- [6] Gatzeva-Topalova PZ, Walton TA, Sousa MC. Crystal Structure of YaeT. Conformational Flexibility and Substrate Recognition. *Structure*, 2008, 16 (12) : 1873-1881.
- [7] Dai XZ, Kawamoto J, Sato SB, Esaki N, Kurihara T. Eicosapentaenoic acid facilitates the folding of an outer membrane protein of the psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 425 (2) : 363-367.
- [8] Saif Hasan S, Baniulis D, Yamashita E, Zhalnina MV,

- Zakharov SD, Stofleth JT, Cramer WA. Methods for studying interactions of detergents and lipids with α -helical and β -barrel integral membrane proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 2013, 74:21-29.
- [9] Khan J, Gupta S, Chattopadhyay K, Mukhopadhaya A. Refolding and functional assembly of the *Vibrio cholerae* porin OmpU recombinantly expressed in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2012, 85 (2) :204-210.
- [10] Tamm LK, Hong H, Liang B. Folding and assembly of β -barrel membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1666 (1-2) :250-263.
- [11] Pocanschi CL, Popot JL, Kleinschmidt JH. Folding and stability of outer membrane protein A (OmpA) from *Escherichia coli* in an amphipathic polymer, amphipol A8-35. *European Biophysics Journal*, 2013, 42 (2-3) :103-118.
- [12] Surrey T, Jahng F. Kinetics of folding and membrane insertion of a β -barrel membrane protein. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 (47) :28199-28203.
- [13] Reusch RN. Insights into the structure and assembly of *Escherichia coli* outer membrane protein A. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 2012, 279 (6) :894-909.
- [14] Debnath D, Nielsen KL, Otzen DE. *In vitro* association of fragments of a β -sheet membrane protein. *Biophysical Chemistry*, 2010, 148 (1-3) :112-120.
- [15] Kleinschmidt JH. Folding kinetics of the outer membrane proteins OmpA and FomA into phospholipid bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2006, 141 (1-2) :30-47.
- [16] Sanchez KM, Kang GP, Wu BJ, Kim JE. Tryptophan-lipid interactions in membrane protein folding probed by ultraviolet resonance raman and fluorescence spectroscopy. *Biophysical Journal*, 2011, 100 (9) :2121-2130.
- [17] Huysmans GH, Radford SE, Baldwin SA, Brockwell DJ. Malleability of the folding mechanism of the outer membrane protein PagP: parallel pathways and the effect of membrane elasticity. *Journal of Molecular Biology* 2012, 416 (3) :453-464.
- [18] Kleinschmidt JH, Tamm LK. Time-resolved distance determination by tryptophan fluorescence quenching: Probing intermediates in membrane protein folding. *Biochemistry*, 1999, 38 (16) :4996-5005.
- [19] Kleinschmidt JH, Bulieris PV, Qu J, Dogterom M, den Blaauwen T. Association of neighboring β -strands of outer membrane protein A in lipid bilayers revealed by site-directed fluorescence quenching. *Journal of Molecular Biology*, 2011, 407 (2) :316-332.
- [20] McMorran LM, Bartlett AI, Huysmans GH, Radford SE, Brockwell DJ. Dissecting the effects of periplasmic chaperones on the *in vitro* folding of the outer membrane protein PagP. *Journal of Molecular Biology*, 2013, 425 (17) :3178-3191.
- [21] Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 2006, 1 (6) :2876-2890.
- [22] Renault M, Saurel O, Demange P, Reat V, Milon A. Solution-state NMR spectroscopy of membrane proteins in detergent micelles: structure of the *Klebsiella pneumoniae* outer membrane protein A, KpOmpA. *Methods in Molecular Biology*, 2010, 654:321-339.
- [23] Kang G, Gary C, Oklejas V, Cao WH, Kim J. Forster resonance energy transfer as a probe of membrane protein folding. *Biophysical Journal*, 2012, 102 (3) :402a-403a.
- [24] Jackups R, Jr., Liang J. Interstrand pairing patterns in β -barrel membrane proteins: the positive-outside rule, aromatic rescue, and strand registration prediction. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 354 (4) :979-993.
- [25] Pogozheva ID, Tristram-Nagle S, Mosberg HI, Lomize AL. Structural adaptations of proteins to different biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1828 (11) :2592-2608.
- [26] Maurya SR, Chaturvedi D, Mahalakshmi R. Modulating lipid dynamics and membrane fluidity to drive rapid folding of a transmembrane barrel. *Science Report-UK*, 2013, 3.
- [27] Otzen DE, Andersen KK. Folding of outer membrane proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2013, 531 (1-2) :34-43.
- [28] Hong H, Rinehart D, Tamm LK. Membrane depth-dependent energetic contribution of the tryptophan side chain to the stability of integral membrane proteins. *Biochemistry*, 2013, 52 (25) :4413-4421.
- [29] Conlan S, Bayley H. Folding of a monomeric porin, OmpG, in detergent solution. *Biochemistry*, 2003, 42 (31) :9453-9465.
- [30] Korkmaz F, Koster S, Yildiz O, Mantele W. In situ opening/closing of OmpG from *E. coli* and the splitting of β -sheet signals in ATR-FTIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2012, 91 :395-401.

- [31] Damaghi M, Bippes C, Koster S, Yildiz O, Mari SA, Kuhlbrandt W, Muller DJ. pH-dependent interactions guide the folding and gate the transmembrane pore of the β -barrel membrane protein OmpG. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 397 (4) :878-882.
- [32] Knowles TJ, Scott-Tucker A, Overduin M, Henderson IR. Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7 (3) :206-214.
- [33] Patel GJ, Behrens-Kneip S, Holst O, Kleinschmidt JH. The periplasmic chaperone Skp facilitates targeting, insertion and folding of OmpA into lipid membranes with a negative membrane surface potential. *Biochemistry*, 2009, 48 (43) :10235-10245.
- [34] Hagan CL, Kim S, Kahne D. Reconstitution of outer membrane protein assembly from purified components. *Science*, 2010, 328 (5980) :890-892.
- [35] Patel GJ, Kleinschmidt JH. The lipid bilayer-inserted membrane protein BamA of *Escherichia coli* facilitates insertion and folding of outer membrane protein A from its complex with Skp. *Biochemistry*, 2013, 52 (23) :3974-3986.
- [36] Ye C, Chai Q, Zhong M, Wei Y. Effect of crowding by ficolls on OmpA and OmpT refolding and membrane insertion. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 2013, 22 (2) :239-245.
- [37] Danoff EJ, Fleming KG. The soluble, periplasmic domain of OmpA folds as an independent unit and displays chaperone activity by reducing the self-association propensity of the unfolded OmpA transmembrane β -barrel. *Biophysical Chemistry*, 2011, 159 (1) :194-204.
- [38] Noinaj N, Kuszak AJ, Gumbart JC, Lukacik P, Chang H, Easley NC, Lithgow T, Buchanan SK. Structural insight into the biogenesis of β -barrel membrane proteins. *Nature*, 2013, 501 (7467) :385-390.

The *in vitro* refolding of β -barrel outer membrane protein of gram-negative bacteria – A review

Xianzhu Dai, Nana Shao, Feng Luo*

Research Center of Bioenergy and Bioremediation, College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: A cell of gram-negative bacteria is surrounded by two layers of membrane, the inner membrane and the outer membrane. Proteins are the major composition of outer membrane. Many outer membrane proteins carry a trans-membrane β -barrel structure that formed by multiple anti-parallel β -strands connected with hydrogen bonds. These proteins can act as porins, transporters, enzymes, receptors, virulence factors and structural proteins. Therefore, their correct folding and membrane integration are important for the survival of gram-negative bacteria. Most β -barrel outer membrane proteins could be easily expressed recombinantly and refolded *in vitro* under certain conditions. The *in vitro* folding processes could be monitored and investigated through many ways, which makes outer membrane proteins become a model system to study the effects of abiotic and biological factors on the folding of membrane proteins. In this article, the research progress on the *in vitro* refolding of outer membrane proteins are reviewed from the aspects of refolding methods, the factors that affect folding processes and experimental methods. Finally, the research prospects in this field are discussed.

Keywords: β -barrel outer membrane proteins, refolding *in vitro*, refolding efficiency

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41301263) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2012C033, SWU112018)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-23-68250109; E-mail: vanlott@hotmail.com

Received: 18 February 2014 / Revised: 30 April 2014