

大肠杆菌 CFT073 中 Curli 系统重要基因 *csgF* 的克隆、表达、纯化和结构分析

陆利^{1,2} 曹保华³ 王义强^{1,2*}

- (1. 中南林业科技大学 经济林育种与栽培国家林业局重点实验室 湖南 长沙 410004)
- (2. 中南林业科技大学 湖南省经济林培育与利用协同创新中心 湖南 长沙 410004)
- (3. 中国科学院生物物理研究所 北京 100101)

摘 要:【目的】对大肠杆菌 CFT073 中 Curli 系统的重要蛋白 CsgF 进行高效表达, 探索其纯化条件和三维结构, 为研究 Curli 生物合成机制提供理论基础。【方法】以大肠杆菌 CFT073 基因组为模板扩增 *csgF* 基因, 构建 pET28a-*csgF*(nsp)-N-6His、pET28a-*csgF*(20–129)-N-6His、pET28a-*csgF*-C-6His 和 pET28a-*csgF*(nsp)-C-6His 等重组质粒, 转化到大肠杆菌 DH5 α 并在 BL21(DE3) 中诱导表达; 通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定 CsgF 蛋白在大肠杆菌中的表达情况, 用 Ni-NTA His Bind Resin 和凝胶排阻层析色谱纯化重组蛋白 CsgF, SDS-PAGE 和 Western blotting 方法鉴定分析; 用 Pull down 实验研究 CsgF 与 CsgG 蛋白的相互作用, 同源模建方法分析重组蛋白 CsgF 的三级结构。【结果】克隆了目的基因 *csgF*, 并筛选出稳定 CsgF 蛋白的条件: 50 mmol/L Sodium acetate (pH 5.0)、150 mmol/L NaCl、5% Glycerol; CsgF 与 CsgG 存在相互作用, CsgF 三维结构模型显示为(β/α)。【结论】获得了高纯度稳定的 CsgF 重组蛋白及其三维结构, 为进一步研究 CsgF 结构与功能奠定了基础。

关键词: 大肠杆菌 CFT073, CsgF, 基因克隆, 蛋白质表达纯化, 凝胶排阻层析色谱

Expression, purification and structural analysis of *csgF* gene of curli systems from *Escherichia coli* CFT073

LU Li^{1,2} CAO Bao-Hua³ WANG Yi-Qiang^{1,2*}

- (1. Key Laboratory of Non-Wood Forest Nurturing and Protection of National Ministry of Education, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)
- (2. Hunan Provincial Cooperative Innovation Center of Non-Wood Forest Cultivation and Utilization, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)
- (3. Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: [Objective] In this experiment we explored the expression, purification condition and

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31570682)

*Corresponding author: E-mail: wangyiqiang12@163.com

Received: October 07, 2015; Accepted: February 03, 2016; Published online (www.cnki.net): March 10, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31570682)

*通讯作者: E-mail: wangyiqiang12@163.com

收稿日期: 2015-10-07; 接受日期: 2016-02-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-10

tertiary structure of the Curli family protein CsgF of *Escherichia coli* CFT073, to provide a theoretical basis for studying the biosynthetic mechanism of Curli. **[Methods]** The *csgF* gene was amplified by PCR from *E. coli* CFT073 genomic DNA, and the recombinant plasmids such as pET28a-csgF(nsp)-N-6His, pET28a-csgF(20-129)-N-6His, pET28a-csgF-C-6His, and pET28a-csgF(nsp)-C-6His, were constructed. These were then transformed into *E. coli* strain DH5 α , and the expression of the *csgF* gene in *E. coli* BL21(DE3) was induced by isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside (IPTG). Next, CsgF was separated and purified by Ni-chelating affinity chromatograph and gel exclusion chromatography, and was determined by SDS-PAGE and Western blotting assay. The protein interaction of CsgF and CsgG was studied by pull down experiments. The tertiary structure of CsgF was constructed based on homology modeling. **[Results]** The purified CsgF protein of high stability was obtained in condition of 50 mmol/L sodium acetate (pH 5.0), 150 mmol/L NaCl and 5% glycerol. Pull down experiments showed there was interaction between CsgF and CsgG. Homology modeling demonstrated that the tertiary structure of CsgF was of (β/α) model. **[Conclusion]** Our findings can lay a foundation for studying the structure and function of CsgF.

Keywords: *Escherichia coli* CFT073, CsgF, Gene cloning, Protein expression and purification, Gel exclusion chromatography

淀粉样蛋白纤维(Amyloids)是一类错误折叠引发疾病的蛋白聚集体。近年来人们在细菌、真菌、蛛形纲动物、鱼和哺乳动物中发现了功能淀粉样蛋白纤维^[1-6]。Curli 是一种典型的功能淀粉样纤维,它是大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和沙门氏菌 (*Salmonella* spp.)中表达产生的一类附着在细胞基质外的纤维^[7]。在生物膜形成过程中, Curli 是细胞外基质重要的组成部分,且具有调节细胞表面的吸附能力、细胞间相互作用和稳定三维结构、促使成熟的生物膜形成等重要功能^[8-10]。此外, Curli 也是细菌抵抗恶劣的外界环境(干旱和抗生素)毒害的一个重要的保护屏障^[11-12]。

Curli 除在细菌生理学方面有重要作用,也是研究淀粉样蛋白形成机制的重要模型。Curli 是由富含 β -折叠的高度有序蛋白质在胞外聚集形成的, 4 nm-7 nm 宽且长无分支的一类具有功能的淀粉样蛋白^[13]。Curli 与一系列淀粉样疾病相关,如阿尔兹海默病 (Alzheimer disease, AD)、帕金森病 (Parkinson's disease, PD)、2 型糖尿病 (Type-2 diabetes)和肾功能衰竭等^[14]。Curli 是由两种亚基组成: CsgA 和 CsgB,且每种亚基都含有 5 个重复的谷氨酸和天冬氨酸模体,均表现出淀粉样蛋白的生化特征^[15-16]。CsgA 聚合物在体外处于无序状态,自

我折叠途径堆积形成纤维,冷静等^[17]以融合表达的方法获得了 MBP-CsgA 融合蛋白。而 CsgA 在细菌外表面有效正确的组装是在 Curli 亚基参与调控下完成。CsgG 寡聚脂蛋白稳定地镶嵌在细胞外膜上,负责输送 Curli 途径中最大亚基 CsgA 和最小亚基 CsgB 到细胞外^[18-19]。黄亿华课题组最近解析出的 CsgG 蛋白晶体结构表明其以九聚体形式镶嵌在外膜上,形成一个非选择性的离子通道^[20], CsgA 和 CsgB 一旦分泌到细胞外膜外侧, CsgB 作为成核剂诱发 CsgA 聚合,通过 Type-VIII 分泌途径形成细胞外基质纤维^[21]。CsgE 和 CsgF 是 Curli 分泌途径中两个重要的分子伴侣,周质空间的 CsgE 直接与 CsgA 相互作用防止其在周质空间过早聚集^[22],暴露在细胞外膜上的 CsgF 参与 CsgB 调控 CsgA 的聚合^[23]。除此之外, CsgD 转录调控因子调控操纵子 *csgBAC* 的表达^[24], CsgC 最新研究表明其具有抑制 CsgA 在体内过早聚集的特性^[25]。Curli 的有效组装过程均需 CsgE 和 CsgF 两种亚基的参与,且发现它们可能与外膜上的 CsgG 蛋白有相互作用,但目前对 CsgF 在 Curli 生物合成途径中的具体作用尚不清楚。

本研究通过在大肠杆菌中克隆、表达大肠杆菌 CFT073 重组 CsgF 蛋白,探索稳定 CsgF 蛋白的条件,最终获得稳定的、高纯度的 CsgF 蛋白,研究

其与 CsgG 蛋白的相互作用, 并对其结构进行初步分析。这为进一步研究 Curli 生物合成机制提供重要的理论根据, 同时也为研究开发治疗淀粉样疾病的药物和筛选重要的药物靶点提供参考。

1 材料与方 法

1.1 菌种、质粒、试剂和仪器

Escherichia coli CFT073 干粉, 购自美国菌种保藏中心(ATCC)。 *E. coli* DH5 α 、 *E. coli* BL21(DE3), 购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶, 购自 New England Biolabs; 氨苄青霉素 (Ampicillin)、卡那霉素(Kanamycin)以及 PCR 引物, 购自上海生工生物工程有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒, 购自天根生化科技(北京)有限公司; 表达载体 pET-28a(+)、 pQLink-N, 购自 Novagen 公

司; DNA Marker、蛋白质 Marker、上样缓冲液, 购自博奥森生物技术有限公司; 高保真 DNA 聚合酶、dNTPs 体系, 购自 GenStar 公司; PVDF 膜, 购自 Invitrogen 公司; 其他试剂均为国产分析纯。 PCR 扩增仪、凝胶成像分析系统、电泳仪, Bio-Rad 公司; 高速离心机, 美国贝克曼库尔特有限公司; AKTA 蛋白纯化系统, 美国通用电气; 超声波细胞破碎仪, 宁波市双嘉仪器有限公司。

1.2 重组质粒的构建

从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)网站获取大肠杆菌 CFT073 中 *csgF* 基因的核酸序列 (AE014075), *E. coli* CFT073 菌的基因组 DNA 以细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取, 1%的琼脂糖凝胶电泳检测。根据序列分析和二级结构预测, 按图 1 所示原理, 设计的引物见表 1, 以 *E. coli* CFT073

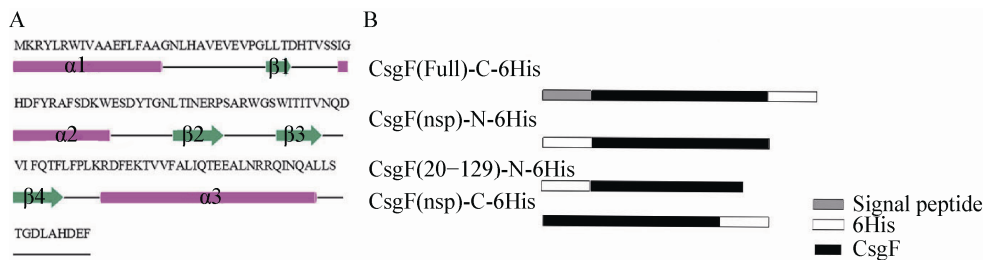


图 1 CsgF 蛋白二级结构预测和重组质粒构建原理

Figure 1 The predicted secondary structure of CsgF and sketch map of recombinant plasmids

注: A: Psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)预测的 CsgF 蛋白质的二级结构图, 其中红色的圆柱代表 α -螺旋结构, 青绿色的箭头代表 β -转角, 黑色的实线代表无序卷曲; B: 根据预测的二级结构设计出构建的重组质粒模式图。

Note: A: The map of secondary structural CsgF was predicted by psipred data, Red columns represent alpha helix structure, Turquoise arrows represent β -corner, The black solid lines represent unordered curled up; B: Schematic diagram of recombinant plasmids.

表 1 用于研究的引物

Table 1 Primers used in the study

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')
pET28a-csgF-C-6His_F	GGAATTCCATATGGGAACCATGACTTTCCAGTCCG
pET28a-csgF-C-6His_R	CGCCAAGCTTAAAAATCGGTTGAGTTATTTTGTAACC
pET28a-csgF(nsp)-C-6His_F	GGAATTCCATATGGGAACCATGACTTTCCAGTCCG
pET28a-csgF(nsp)-C-6His_R	CGCCAAGCTTAAAAATCGGTTGAGTTATTTTGTAACC
pET28a-csgF(nsp)-N-6His_F	GGAATTCCATATGCACCATCACCATCACCATGGAACCATGACTTTCCAGTCCG
pET28a-csgF(nsp)-N-6His_R	CGCCAAGCTTTTTAAAAATCGGTTGAGTTATTTTGTAACC
pET28a-csgF(20-129)-N-6His_F	GGAATTCCATATGCACCATCACCATCACCATGGAACCATGACTTTCCAGTCCG
pET28a-csgF(20-129)-N-6His_R	CGCCAAGCTTTTATTGGACCTACCAGCTCCA

注: nsp: 没有信号肽。

Note: nsp: No signal peptide.

的基因组 DNA 为模板,克隆出 *csgF* 基因的不同核酸片段,1%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。PCR 扩增体系为: gDNA 1 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, 2.5 mmol/L MgCl₂ 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 5 μ L, 5 U/ μ L 高保真的 DNA 聚合酶 0.5 μ L, 10 μ mol/L 上游引物和下游引物各 1 μ L, ddH₂O 补齐至 50 μ L。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 1 min (延伸时间根据 1 kb/min 计算), 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。Nde I/Hind III 双酶切 PCR 产物和 pET-28a(+)质粒,酶切产物用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收, T4 连接酶连接, 室温连接 1 h 转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 涂布卡那霉素(Kanamycin)抗性平板进行培养, 挑取单菌落依次进行质粒的提取、酶切和测序, 测序由北京睿博生物科技有限公司完成。

1.3 蛋白的表达

将构建好的重组质粒转化到 *E. coli* BL21 中, 挑取单菌落接种于 5 mL 卡那霉素(50 mg/L)抗性的 LB 液体培养基^[26]中, 活化培养过夜, 再按 1:1 000 的比例接种到 1 L 卡那霉素抗性的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养。0.1 mmol/L 的 IPTG、18 $^{\circ}$ C、220 r/min 诱导 18–20 h。4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 30 min 收集菌体, 菌体沉淀溶解于 30 mL Buffer A 重悬, Buffer A: 20 mmol/L Tri-HCl pH 7.0、150 mmol/L NaCl、5% Glycerol; 超声波破碎细菌 0 $^{\circ}$ C, 30 W, 超声工作 1 s, 间隔 5 s, 共超声 5 min, 4 $^{\circ}$ C、18 000 r/min 离心 1 h, 取上清液和沉淀溶解于上样缓存液中, 在 15% SDS-PAGE 电泳分析。

1.4 重组蛋白 Western blotting 鉴定

取 10 μ L 纯化后的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 凝胶在 TTBS 中平衡 20 min 后, 转印 40 min 至 PVDF 膜上; 取出 PVDF 膜放入含 1 g/L BSA 的 TTBS 中 1 h; 将抗 6His 标签的单抗(1:3 000 稀释)浸泡膜并 4 $^{\circ}$ C 过夜, 以缓冲液 TTBS 洗涤膜 3 次, 每次 10 min, 加入 HRP 标记的羊抗小鼠抗体(1:3 000 稀释), 置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 以缓冲液 TTBS 洗涤膜 3 次, 每次 10 min, 将 PVDF 膜放入显色底物溶液, DAB 显色 10–30 min, 用 ddH₂O 洗膜, 终

止反应, 观察。

1.5 脂溶性 CsgF 蛋白的纯化

将诱导表达的菌液离心收集, 超声波细胞破碎, 离心弃除上清, 离心沉淀溶解于 Buffer B: 25 mmol/L Tris-HCl pH 7.0、150 mmol/L NaCl、5% Glycerol、1% N-lauroylsarcosine (LDAO), 匀浆, 4 $^{\circ}$ C 搅拌孵育 1 h。蛋白液 4 $^{\circ}$ C、18 000 r/min 离心 1 h, 收集上清液, 加到预冷的 Ni-resin 中; 4 $^{\circ}$ C 搅拌孵育 1 h 装柱; 10 倍柱体积的咪唑梯度洗脱杂蛋白, 5 倍柱体积的 300 mmol/L 咪唑洗脱, 获得目的蛋白 CsgF-C-6His, 用 Millipore 超滤浓缩管(MWCO: 15 kD)浓缩至 500 μ L, 上样于装有 Superose6 10/300 GL 的 AKTA 蛋白纯化系统进行分析, 分子筛 Buffer D: 25 mmol/L Tris-HCl pH 7.0、150 mmol/L NaCl、5% Glycerol、0.1% LDAO, 结果蛋白不稳定。随后探索稳定蛋白的条件: 改变甘油浓度 10%, 从 DDM、DM、OG 中筛选合适的去污剂, 改变 Buffer 的 pH 值为 5.0–9.0。

1.6 水溶性 CsgF 蛋白的纯化

将诱导表达的菌液离心收集, 超声波细胞破碎, 离心弃除沉淀, 收集上清液, 加到预处理、预冷 2 mL Ni-resin 中, 4 $^{\circ}$ C 搅拌孵育 1 h 后装柱; 10 倍柱体积的咪唑梯度洗脱杂蛋白, 5 倍柱体积的 300 mmol/L 咪唑洗脱, 获得目的蛋白 CsgF(nsp)-C-6His、CsgF(nsp)-N-6His。用 Millipore 超滤浓缩管(MWCO: 15 kD)将目的蛋白浓缩至 500 μ L, 上样装有 Superose6 10/300 GL 的 AKTA 蛋白纯化系统进行分析, Buffer A: 20 mmol/L Tri-HCl pH 7.0、150 mmol/L NaCl、5% Glycerol, 结果表明蛋白质还是不稳定。随后开展优化去污剂和 Buffer 的条件。最终 CsgF 截短体能稳定存在于 Buffer E: 50 mmol/L 醋酸钠 pH 5.0、150 mmol/L NaCl、5% Glycerol。

1.7 CsgG 蛋白的表达纯化

csgG 基因克隆到 pQLink-N 载体上进行表达, 将构建好的重组质粒 pQLink-CsgG 转化到 *E. coli* BL21 中, 挑取单菌落接种于 Amp 抗性 1 L 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 下培养 OD 值至

0.6–0.8, 0.1 mmol/L IPTG、18 °C、220 r/min 诱导表达 18–20 h。4 °C、4 000 r/min 离心 30 min 收集菌体。用 Buffer A 重悬菌体, 超声波破碎细胞, 4 °C、18 000 r/min 离心 1 h, 弃上清, 沉淀溶解于 Buffer F: 25 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、5% Glycerol、1% Sarkosyl; 4 °C 搅拌孵育 1 h; 再 4 °C、18 000 r/min 离心 1 h, 弃上清, 沉淀溶解于 Buffer D; 4 °C 搅拌孵育 1 h; 再 4 °C、18 000 r/min 离心 1 h, 保留上清液, 取样 10% SDS-PAGE 电泳检测。

1.8 CsgF 与 CsgG 的 Pull down 实验

将预先纯化的 CsgF-N-6His、CsgF-C-6His、CsgF-(20–129)-N-6His 融合蛋白用透析法去除 Buffer E 中咪唑, 用 BCA protein 分析试剂盒测定浓度, 加到 Buffer G 预平衡、预冷的 2 mL 钴螯合 Resin 中, Buffer G: 50 mmol/L 醋酸钠 pH 5.0、150 mmol/L NaCl、5% Glycerol、40 mmol/L Imidazole; 4 °C 孵育 1 h, 装柱; Buffer G 洗脱未结合的杂蛋白(每次 10 mL, 洗 5 次), 将固定化 CsgF 的钴 Resin 转移至预冷的小锥形瓶中(4 °C); 同时用 AKTA 蛋白纯化系统将 CsgG 蛋白中的 Buffer 交换成 Buffer H (50 mmol/L 醋酸钠 pH 5.0、150 mmol/L NaCl、5% Glycerol、0.1% LDAO), Millipore 超滤浓缩管(MWCO: 30 kD)浓缩至 2 mL; 再平衡 CsgG 蛋白液中咪唑浓度为 40 mmol/L, 将 CsgG 蛋白液与 CsgF 蛋白液 4 °C 温柔搅拌孵育 1 h, 装柱, 用 Wash buffer (50 mmol/L 醋酸钠 pH 5.0、150 mmol/L NaCl、5% Glycerol、0.1% LDAO、40 mmol/L Imidazole) 洗脱, 未结合蛋白; Elution buffer: 50 mmol/L 醋酸钠 pH 5.0、150 mmol/L NaCl、5% Glycerol、0.1% LDAO、300 mmol/L Imidazole 洗脱, 获得目的蛋白。目标蛋白用 Millipore 超滤浓缩管(MWCO: 30 kD)浓缩至 500 μ L, 上样于装有 Superose6 10/300 GL 的 AKTA 蛋白纯化系统进行分析, 收集峰尖几管蛋白样品, 制样用 15% SDS-PAGE 电泳检测。

1.9 CsgF 蛋白的结构分析

csgF 基因的核酸序列和蛋白序列从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上获取, 采用 In silico 方法进行分析。信号肽和亚细胞定位分别从 Uniprot

(<http://www.uniprot.org/>) 和 TMHMM (<http://www.cds.dtu.dk/services/TMHMM-2.>) 进行预测。CsgF 蛋白质的二级结构通过蛋白质二级结构预测平台预测(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)。CsgF 蛋白与其他蛋白相互作用通过 STRING 数据库进行预测 (<http://string-db.org>)。三级结构使用 SWISS-MODEL 服务平台基于同源性进行建模。

2 结果与分析

2.1 *csgF* 基因的克隆

PCR 技术克隆出 *csgF* 基因不同长度的核酸片段(图 2), 大约 417 bp 的 DNA 片段, 含有 139 个完整的开发阅读框(ORF), 编码 139 个氨基酸, 分子量约为 15 kD。*csgF* 基因的不同片段克隆到 pET-28a(+) 表达载体中, 得图 1 中 4 种重组质粒, *Nde* I/*Hind* III 双酶切鉴定正确, 测序结果也表明: 重组质粒中插入序列完全正确。

2.2 蛋白的表达纯化

pET28a-*csgF*(Full)-C-6His、pET28a-*csgF*(nsp)-C-6His、pET28a-*csgF*(nsp)-N-6His、pET28a-*csgF*(20–129)-N-6His 四种重组质粒分别转化到 *E. coli*

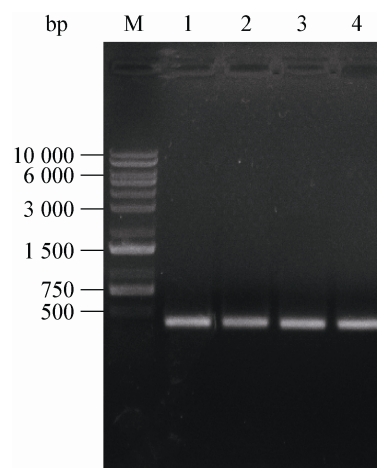


图 2 目的片段的 PCR 扩增电泳图

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of target PCR products
注: M: DNA marker DL10000; 1: CsgF 的 C 端带 6 个 His 的扩增片段; 2: CsgF 无信号肽 C 端带 6 个 His 的扩增片段; 3: CsgF 无信号肽 N 端带 6 个 His 的扩增片段; 4: CsgF 截短体 (20–129) N 端带 6 个 His 的扩增片段。

Note: M: DNA marker DL10000; 1: CsgF(Full)-C-6His; 2: CsgF(nsp)-C-6His; 3: CsgF(nsp)-N-6His; 4: CsgF(20–129)-N-6His.

BL21(DE3)中, 异源表达产 CsgF-6His 标签的融合蛋白。终浓度为 0.1 mmol/L IPTG 18 °C 低温诱导 CsgF 蛋白表达, 镍柱亲和层析纯化, 15% SDS-PAGE 电泳分析结果如图 3 所示, 结果表明目的蛋白 CsgF 不管是在膜上还是在胞质中均能表达。

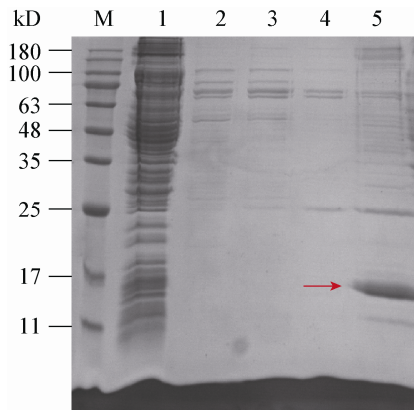


图 3 重组 CsgF 蛋白纯化 SDS-PAGE 电泳检测
Figure 3 SDS-PAGE analysis of CsgF purified through Ni-chelating affinity chromatography

注: M: 标准蛋白分子量标记; 1: 流穿液; 2: 25 mmol/L 咪唑的洗脱液; 3: 40 mmol/L 咪唑的洗脱液; 4: 50 mmol/L 咪唑的洗脱液; 5: 300 mmol/L 咪唑洗脱液。

Note: M: Standard protein marker; 1: Flow through liquid; 2: Buffer A contain of 25 mmol/L imidazole; 3: Buffer A contain of 40 mmol/L imidazole; 4: Buffer A contain of 50 mmol/L imidazole; 5: Buffer A contain of 300 mmol/L imidazole.

为获得低盐高浓度稳定的 CsgF 蛋白, 需对镍柱亲和层析纯化后的 CsgF 蛋白用凝胶排阻层析 (Gel exclusion chromatography) 进行纯化。用 Millipore 超滤浓缩管 (MWCO: 30 kD) 在 4 °C、3 000 r/min 下浓缩过程中, 观察到白色沉淀产生, 离心取上清 500 μ L 上样于装有 Superose 6 10/300GL 的 AKTA 蛋白纯化系统进行分析, 结果未观察到目的蛋白吸收峰。优化 Buffer 条件: pH 梯度 5.0–9.0; 去污剂 DDM、LDAO、OG、NG 及盐浓度 150–500 mmol/L NaCl 和醋酸钠 Buffer 等, AKTA 蛋白纯化系统检测分析及 15% SDS-PAGE 电泳结果如图 4 所示, 结果表明只有 CsgF (20–129) 截短体蛋白能稳定存在于 Buffer E (50 mmol/L 醋酸钠 pH 5.0、150 mmol/L NaCl、5% Glycerol)。

为研究 CsgF 与 CsgG 的互作关系, 需重组表达纯化 CsgG 蛋白。CsgG 蛋白表达纯化结果如图 5 所示, 300 mmol/L 咪唑洗脱液可以将 CsgG 蛋白洗脱下来, 并且获得了比较纯的 CsgG 蛋白。

2.3 CsgF 与 CsgG 的相互作用

CsgF 是一类锚定在外膜外侧的一类膜蛋白, 黄亿华课题组^[20]发现 CsgG 镶嵌在外膜上以九聚体的形式形成了一个跨膜通道, 这个跨膜通道有一个中央空腔和前庭组成, CsgG 周质侧与周质空间形成

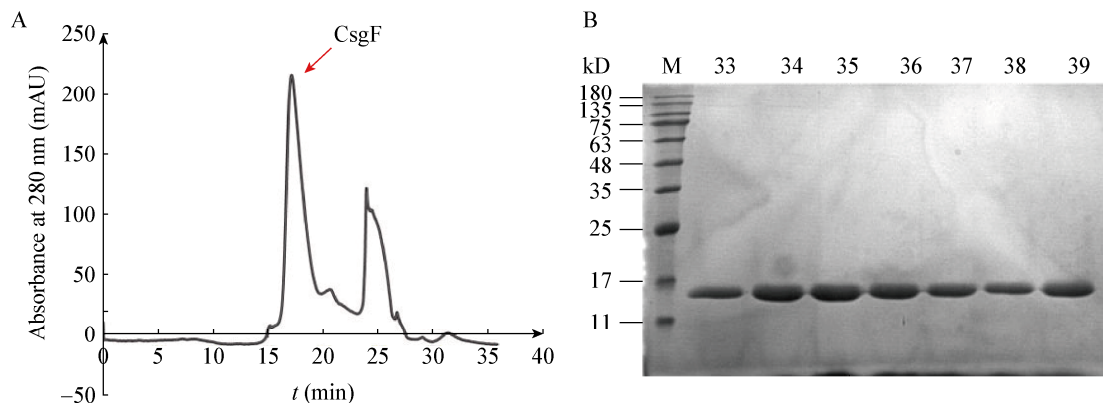


图 4 CsgF (20–129)截短体的稳定性分析

Figure 4 Stability analysis of CsgF (20–129) truncated body

注: A: CsgF (20–129)截短体在醋酸钠 Buffer 下稳定存在的峰图; B: 样品(33–39) 15% SDS-PAGE 电泳检测; M: 标准蛋白分子量标记。

Note: A: The peak of CsgF (20–129) truncated body represent stability under sodium acetate buffer; B: The samples from the peak point location (33–39) detected by 15% SDS-PAGE electrophoresis; M: Standard protein marker.

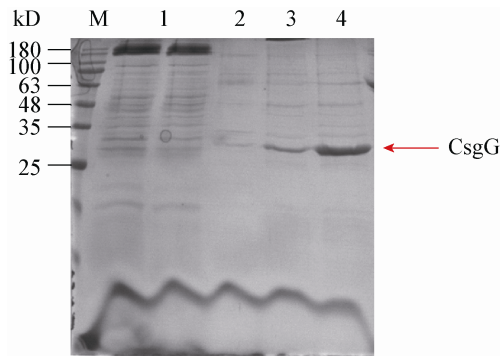


图 5 重组 CsgG 蛋白纯化 SDS-PAGE 电泳检测
Figure 5 SDS-PAGE analysis of CsgG purified through Ni-chelating affinity chromatography

注: M: 标准蛋白分子量标记; 1: 流穿液; 2: 25 mmol/L 咪唑的洗脱液; 3: 40 mmol/L 咪唑的洗脱液; 4: 50 mmol/L 咪唑的洗脱液; 5: 300 mmol/L 咪唑洗脱液。

Note: M: Standard protein marker; 1: Flow through liquid; 2: Buffer A contain 25 mmol/L imidazole; 3: Buffer A contain 40 mmol/L imidazole; 4: Buffer A contain 50 mmol/L imidazole; 5: Buffer A contain 300 mmol/L imidazole.

的区域被九聚体的水溶蛋白 CsgE 盖住, 并选择性的调控 CsgA 蛋白的进出。而 CsgF 也可能以九聚体的形式与 CsgG 的外膜外侧部分相互作用。为验证其相互作用, 采用 His-pull down 实验方法验证, 分别采用带 His 标签的 CsgF 蛋白与无 His 标签 CsgG 的 Pull down 和带 His 标签的 CsgG 蛋白与无 His 标签 CsgF 的 Pull down, Pull down 实验结果表明: 带 His 标签的 CsgG 能把无 His 标签的 CsgF 蛋白 Pull down, 而带 His 标签的 CsgF 蛋白却不能把无 His 标签的 CsgG 蛋白 Pull down。为进一步观察 CsgG 与 CsgF 复合物的分子状态, 将 CsgG-C-6His-CsgF 复合物的蛋白液浓缩, 上样于装有 Superouse6 10/300GL 的 AKTA 蛋白纯化系统进行分析, 观察发现出峰的保留时间前移, 并收集峰尖位置的蛋白样品制样用 15% SDS-PAGE 电泳分析, 电泳分析的结果见图 6, 结果表明 28-35 管的泳道均出现两条带, 且两条带的位置与 CsgG、CsgF 大小相一致。为进一步分析其结合比例, 采用 Gel-Pro analyzer 4.0 软件对 CsgG 和 CsgF 蛋白灰度定量分析, 如表 2 所示, CsgG 与 CsgF 结合的比例暂无法确定, 上述结果表明 CsgG 与 CsgF 存在相互作用。

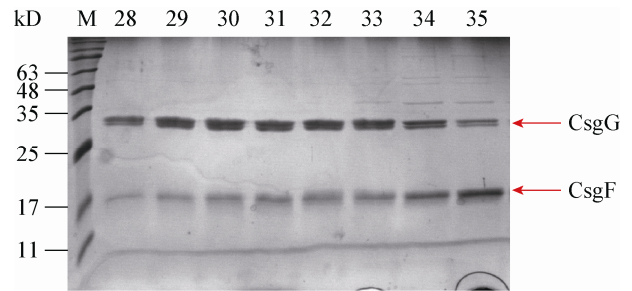


图 6 CsgF 与 CsgG 的 Pull down 实验电泳检测
Figure 6 SDS-PAGE analysis of experimental result of CsgF pull down CsgG

注: M: 标准蛋白分子量标记。

Note: M: Standard protein marker.

泳道 Lane	淀粉样蛋白 G CsgG (ng)	淀粉样蛋白 F CsgF (ng)
1	224.59	60.02
2	321.09	96.66
3	358.89	135.44
4	304.76	139.81
5	338.43	178.32
6	323.14	170.83
7	240.41	236.44
8	131.88	313.45

2.4 CsgF 蛋白的结构分析

CsgF 蛋白是由 138 个氨基酸组成, 理论分子质量为 15.05 kD, 理论 pI 为 5.59, CsgF 在 1-19 个氨基酸为信号肽序列, 并且定位在胞外膜外侧(图 7)。二级结构预测 59.8%是 α -螺旋, 10.3%是 β -折叠, 29.9%是无规则卷曲, 基于 CsgF 同源性构建三维结构模型(图 8)。

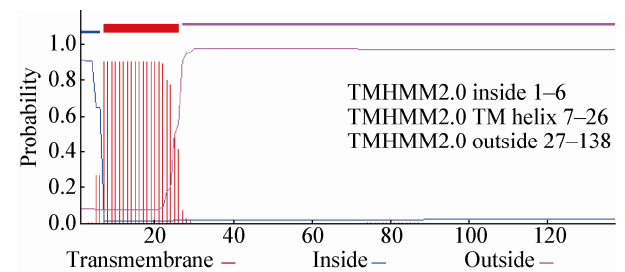


图 7 CsgF 亚细胞定位和跨膜区预测
Figure 7 Location of subcellular and prediction of transmembrane of CsgF protein

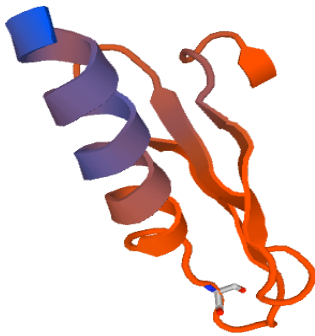


图 8 CsgF 蛋白的三维结构模型

Figure 8 The three-dimensional structural model of CsgF protein

3 讨论

CsgF 是一种定位在细胞外膜上的外膜蛋白。在 Curli 分泌系统中, CsgF 负责将从 CsgG 孔道转运过来的 CsgA 呈递给 Curli 成核中心蛋白 CsgB, 然后 CsgA 组装形成 Curli 纤维。本文研究 *E. coli* CFT073 菌中的 *csgF* 基因 通过表达载体 pET-28a(+) 克隆表达。首先是表达脂溶性的 CsgF 蛋白(其原始定位于细胞外膜上), 以去污剂将 CsgF 蛋白从外膜上提取出来, 通过亲和层析和 AKTA 蛋白纯化系统纯化, 结果 CsgF 蛋白吸收峰特别低, 并且以高聚体的形式存在。当将 CsgF 蛋白在胞质中表达, 分别构建除去信号肽序列的 N 端和 C 端带 6 个 His 的 CsgF 融合蛋白, 将重组质粒转到 *E. coli* BL21(DE3)中。37 °C 诱导表达时, CsgF 蛋白主要以包涵体的形式存在。为获得水溶性的 CsgF 蛋白, 通过降低诱导表达温度至 18 °C, 结果获得高表达水溶性的 CsgF 蛋白, 亲和层析和 AKTA 蛋白纯化系统纯化, 结果发现与脂溶性的 CsgF 一样, 吸收峰特别低且电泳未观察到 CsgF 蛋白带, 说明 CsgF 在该 Buffer 条件下不稳定。尝试在不同温度(4 °C 和 16 °C)、不同的 pH 值范围(5.0–9.0)、添加 1 倍 CMC 浓度的不同去污剂(LDAO、DDM、OG、C₈E₄)、盐离子浓度(150、300、500 mmol/L NaCl)、Tris-HCl buffer 和醋酸钠 Buffer 的条件, 结果均未能获得稳定的 CsgF 蛋白。最后, 根据预测的二级结构结果, 截掉 C 端柔性较大的部分, 重新构建了 CsgF

(20–129)截短体, 最后在醋酸钠 Buffer E 中获得了稳定的 CsgF (20–129)截短体蛋白。

根据 STRING 数据库预测表明 CsgF 与 CsgG、CsgE、CsgD 存在互作关系, 为验证 CsgG 与 CsgF 是否存在互作关系, 同时也为了进一步揭示 CsgF 在 Curli 分泌途径中的功能, 采用 Pull down 实验研究两种蛋白的互作关系。分别设计两种 Pull down 实验方案: 一种是带 His 标签的 CsgF 与无 His 标签的 CsgG 蛋白 Pull down; 另一种是带 His 标签的 CsgG 与无 His 标签的 CsgF 蛋白 Pull down。当 Buffer E 中的 CsgF 蛋白与 Buffer D 中的 CsgG 蛋白进行 Pull down 实验, 未观察到 CsgG 与 CsgF 蛋白有互作。CsgG 存在于有去污剂(LDAO)的 Buffer D 中, LDAO 可能在 CsgG 外表面形成胶束团隔离其与 CsgF 蛋白的互作。改进 Pull down 实验条件, 将 CsgG 蛋白的 Buffer 交换成醋酸钠 Buffer, 再进行 Pull down 实验, 观察到同一泳道出现两条带, 而阴性对照和阳性对照却均只有一条带, 表明 CsgG 与 CsgF 蛋白之间确实存在互作关系。为进一步研究其结合强度及比例, 通过 AKTA 蛋白纯化系统将 CsgG/CsgF 蛋白复合物浓缩上样, 结果进一步表明 CsgG 与 CsgF 蛋白存在互作关系。由于影响其结合比例的因素比较多, 如 Buffer 的 pH 值、离子浓度, 蛋白灰度定量分析结果暂时无法判断其结合比例。此外, CsgF 蛋白本身不能稳定存在于醋酸钠 Buffer 中, 而在与 CsgG 进行 Pull down 实验中, 发现 CsgG 能稳定 CsgF 蛋白在醋酸钠 Buffer 中存在。这一现象进一步说明 CsgF 与 CsgG 蛋白存在互作关系。同时 Matthews 也预测 CsgF 能与 CsgG 蛋白以某种特定的比例结合形成一个稳定高效的转运机器, 完成 CsgA 蛋白的转运及组装^[27]。本研究将着重研究 CsgF 与 CsgG、CsgB 互作位点, 根据 CsgF 预测的三维结构, 筛选一些关键位点开展定点突变实验, 为开发新型的治疗淀粉样蛋白变性病筛选药物靶点提供重要的理论根据。

参考文献

- [1] Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, et al. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber

- formation[J]. *Science*, 2002, 295(5556): 851-855
- [2] Elliot MA, Karoonuthaisiri N, Huang JQ, et al. The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Genes & Development*, 2003, 17(14): 1727-1740
- [3] True HL, Lindquist SL. A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity[J]. *Nature*, 2000, 407(6803): 477-483
- [4] Kenney JM, Knight D, Wise MJ, et al. Amyloidogenic nature of spider silk[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(16): 4159-4163
- [5] Podrabsky JE, Carpenter JF, Hand SC. Survival of water stress in annual fish embryos: dehydration avoidance and egg envelope amyloid fibers[J]. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2001, 280(1): R123-R131
- [6] Fowler DM, Koulov AV, Alory-Jost C, et al. Functional amyloid formation within mammalian tissue[J]. *PLoS Biology*, 2006, 4(1): e6
- [7] Collinson SK, Emödy L, Müller KH, et al. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(15): 4773-4781
- [8] Austin JW, Sanders G, Kay WW, et al. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 162(2): 295-301
- [9] Vidal O, Longin R, Prigent-Combaret C, et al. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(9): 2442-2449
- [10] Kikuchi T, Mizunoe Y, Takade A, et al. Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells[J]. *Microbiology and Immunology*, 2005, 49(9): 875-884
- [11] Ryu JH, Beuchat LR. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 247-254
- [12] White AP, Gibson DL, Kim W, et al. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(9): 3219-3227
- [13] Shewmaker F, McGlinchey RP, Thurber KR, et al. The functional curli amyloid is not based on in-register parallel β -sheet structure[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(37): 25065-25076
- [14] Moreno-Gonzalez I, Soto C. Misfolded protein aggregates: Mechanisms, structures and potential for disease transmission[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2011, 22(5): 482-487
- [15] Hammer ND, Schmidt JC, Chapman MR. The curli nucleator protein, CsgB, contains an amyloidogenic domain that directs CsgA polymerization[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(30): 12494-12499
- [16] Collinson SK, Parker JMR, Hodges RS, et al. Structural predictions of AgfA, the insoluble fimbrial subunit of *Salmonella* thin aggregative fimbriae[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 290(3): 741-756
- [17] Leng J, Zheng Y, Zeng X, et al. Expression and purification of MBP-CsgAIII fusion protein[J]. *Immunological Journal*, 2006, 22(4): 390-392 (in Chinese)
冷静, 郑禹, 曾霞, 等. MBP-CsgAIII融合蛋白的表达和纯化[J]. *免疫学杂志*, 2006, 22(4): 390-392
- [18] Robinson LS, Ashman EM, Hultgren SJ, et al. Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(3): 870-881
- [19] Loferer H, Hammar M, Normark S. Availability of the fibre subunit CsgA and the nucleator protein CsgB during assembly of fibronectin-binding curli is limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein CsgG[J]. *Molecular Microbiology*, 1997, 26(1): 11-23
- [20] Cao BH, Zhao Y, Kou YJ, et al. Structure of the nonameric bacterial amyloid secretion channel[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(50): E5439-E5444
- [21] Bian Z, Normark S. Nucleator function of CsgB for the assembly of adhesive surface organelles in *Escherichia coli*[J]. *The EMBO Journal*, 1997, 16(19): 5827-5836
- [22] Nenninger AA, Robinson LS, Hammer ND, et al. CsgE is a curli secretion specificity factor that prevents amyloid fibre aggregation[J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 81(2): 486-499
- [23] Nenninger AA, Robinson LS, Hultgren SJ. Localized and efficient curli nucleation requires the chaperone-like amyloid assembly protein CsgF[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(3): 900-905
- [24] Hammar M, Arnqvist A, Bian Z, et al. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin-and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* k-12[J]. *Molecular Microbiology*, 1995, 18(4): 661-670
- [25] Evans ML, Chorell E, Taylor JD, et al. The bacterial curli system possesses a potent and selective inhibitor of amyloid formation[J]. *Molecular Cell*, 2015, 57(3): 445-455
- [26] Anderson EH. Growth requirements of virus-resistant mutants of *Escherichia coli* strain "B"[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1946, 32(5): 120-128
- [27] Taylor JD, Matthews SJ. New insight into the molecular control of bacterial functional amyloids[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015, 5: 33