

研究报告

鼠伤寒沙门氏菌 c-di-GMP 结合蛋白 YcgR 的表达、 纯化及活性鉴定

闫春娟^{1,2} 欧阳震霖³ 冉淦侨^{1,4*}

(1. 陕西省生物农业研究所 陕西 西安 710043)

(2. 陕西省酶工程技术研究中心 陕西 西安 710600)

(3. 西安交通大学生命科学与技术学院 陕西 西安 710049)

(4. 中国科学院西北生物农业中心 陕西 西安 710043)

摘要:【背景】在鼠伤寒沙门氏菌中, c-di-GMP 结合蛋白 YcgR 通过与鞭毛运动蛋白的相互作用, 抑制鞭毛运动速度, 使细菌由浮游生长向生物膜产生及侵染宿主的静止状态转变。然而, 目前关于该蛋白的结构、功能以及与 c-di-GMP 结合后调控细菌运动状态的分子机制还不清楚。

【目的】通过原核表达, 获得高纯度的 YcgR 蛋白, 并对其二级结构稳定性以及 c-di-GMP 结合活性进行表征, 为进一步确定 YcgR 的结构以及阐明 c-di-GMP 如何通过结合 YcgR 而减缓细菌运动速度的分子机制奠定基础。【方法】通过构建重组大肠杆菌对 YcgR 进行原核表达; 通过 Ni-NTA 镍离子亲和层析柱和体积排阻色谱两步纯化获得高纯度的 YcgR 蛋白; 预测 YcgR 蛋白质结构, 利用圆二色光谱仪(CD)测定其二级结构; 通过等温滴定量热法(ITC)和热转移技术(Protein thermal shift)研究 YcgR 与 c-di-GMP 的结合活性。【结果】菌落 PCR 和质粒测序结果表明, 表达 YcgR 的重组大肠杆菌构建成功; SDS-PAGE 和体积排阻色谱显示 YcgR 的分子量大约为 28 kD, 在溶液中以二聚体的形式存在; 通过预测和对比, 发现 YcgR 的结构与同源蛋白 PP4396 高度相似, 都有一个响应 c-di-GMP 的 PilZ 结构域, 且 CD 结果显示 YcgR 具有稳定的二级结构; ITC 和 Thermal Shift 结果表明, YcgR 与 c-di-GMP 有较强的结合活性, 其 K_d 值为 50 nmol/L。【结论】首次实现了鼠伤寒沙门氏菌 YcgR 蛋白的原核表达及纯化, 表征了其 c-di-GMP 结合活性, 为进一步研究 YcgR 蛋白与细菌信号分子 c-di-GMP 调控鞭毛运动的分子机制奠定基础, 并为鼠伤寒沙门氏菌抗感染药物的研发和治疗提供新的策略。

关键词: 沙门氏菌, YcgR 蛋白, c-di-GMP, 克隆表达及纯化, 结构预测

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (21306110); Natural Science Foundation of Shaanxi Province (2017JM2034); Excellent Youth Foundation of Shaanxi Academy of Sciences (2017K-13)

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

Received: June 20, 2017; **Accepted:** August 10, 2017; **Published online** (www.cnki.net): August 30, 2017

基金项目: 国家自然科学基金(21306110); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2017JM2034); 陕西省科学院优秀青年基金(2017K-13)

*通信作者: E-mail: ranganqiao@163.com

收稿日期: 2017-06-20; 接受日期: 2017-08-10; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-08-30

Expression, purification and characterization of c-di-GMP binding protein YcgR from *Salmonella typhimurium*

YAN Chun-Juan^{1,2} OUYANG Zhen-Lin³ RAN Gan-Qiao^{1,4*}

(1. Bio-Agriculture Institute of Shaanxi, Xi'an, Shaanxi 710043, China)

(2. Enzyme Engineering Research Center of Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi 710600, China)

(3. School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China)

(4. Northwest Agrobiolgy Center, Chinese Academy of Sciences, Xi'an, Shaanxi 710043, China)

Abstract: [Background] In the *Salmonella typhimurium*, the c-di-GMP binding protein YcgR could inhibit flagellar motor speed by interacting with flagellar protein, which cause the bacteria stop migrate, generate biofilm and infect the host. However, the structure and functions of YcgR as well as the molecular mechanism of YcgR suppressing bacterial motion after binding to c-di-GMP are not clear. [Objective] In this study, YcgR protein was expressed and purified in recombinant *E. coli*, and then the c-di-GMP binding activity of YcgR were further characterized, which could lay a foundation for determining the structure of YcgR and clarifying how c-di-GMP binding protein YcgR slowing the movement of *Salmonella typhimurium*. [Methods] The recombinant *E. coli* was constructed for expressing YcgR protein, which was further purified by Ni-NTA and SEC (Size exclusion chromatography). After that, we predicted the structure of YcgR protein by comparing with other homologous family proteins, and the secondary structure of YcgR was determined by circular dichroism (CD). Finally, the binding parameters of YcgR and c-di-GMP were determined by isothermal titration calorimetry (ITC) and protein thermal shift. [Results] Colony PCR and DNA sequencing results showed that the recombinant *E. coli* for expressing YcgR was successfully constructed. The size exclusion chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis showed that the molecular weight of YcgR was 28 kD and existed as dimer in the supernatant. The structure of YcgR is highly similar to the homologous protein PP4396, which has a PilZ domain for binding c-di-GMP, and CD results showed that YcgR had a stable secondary structure. In addition, ITC and Thermal Shift indicated that YcgR had a strong and specific binding activity with c-di-GMP, and the K_d value was 50 nmol/L. [Conclusion] The YcgR protein from *Salmonella typhimurium* was successfully expressed in *E. coli* for the first time, and its c-di-GMP binding activity were also characterized in this study, which is very important for the study of the molecular mechanism of c-di-GMP binding protein YcgR regulating flagellin, and provide a new strategy for bacterial anti-infective therapy.

Keywords: *Salmonella*, YcgR protein, c-di-GMP, Cloning expression and purification, Structural prediction

鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)属于食源性革兰氏阴性致病菌^[1],主要发现于肠腔中,其宿主范围极其广泛、环境适应能力强且具有较强的致病性^[2],是对人类健康产生威胁的重要传染性病原菌^[3]。在鼠伤寒沙门氏菌侵染宿主的过程中,当细菌感应到外界环境的变化,细菌会主动从浮游生长向静止状态过度,这种状态会促进细菌生物膜的形成和毒力因子的产生^[4],有助于细菌在宿主环境中生存,并在宿主中产生持续性的感染^[5]。有研究表明^[6],在细菌从运动向静止的状态转换过

程中,c-di-GMP作为第二信使分子参与了许多细胞过程的信号转导^[7-8],如生物膜的形成等^[9-10];其结合蛋白YcgR可以通过结合鞭毛马达蛋白来调控细菌的运动状态^[11]。

目前关于鼠伤寒沙门氏菌中YcgR蛋白的结构、功能以及与信号分子c-di-GMP结合后调控细菌运动状态的分子机制还不清楚。根据已有的同源蛋白的研究工作和生物信息学分析可以得出,PilZ结构域可能是c-di-GMP的效应器^[12-13],目前这一推论已通过一系列的蛋白结合和突变等实验手段

在多种细菌来源的 PilZ 蛋白家族中得到验证^[14]。来自霍乱菌^[15]和铜绿假单胞菌^[16]的 PilZ-c-di-GMP 复合物的晶体结构显示, c-di-GMP 与九个保守残基中的多个残基均有联系, 这说明 c-di-GMP 与 PilZ 蛋白家族的结合依赖于 RxxxR 和 D/NxSxxG 序列基序中的残基。在鼠伤寒沙门氏菌中, YcgR 是具有 PilZ 结构域的蛋白, 可以结合 c-di-GMP^[12], 同时该蛋白还是鞭毛马达调节子的成员。鞭毛马达由位于基体底座的转子和横跨细胞质膜的定子组成^[17-18]。转子作为马达开关, 包含 3 个亚基: FliG、FliM 和 FliN^[19]。定子是由膜蛋白 MotA 和 MotB 组成的 MotA4-MotB2 复合物, 且 MotA 与转子蛋白 FliG 之间存在相互作用^[20-21]。早期关于 YcgR 在鞭毛马达上如何发挥作用的研究工作来自 Ko 和 Park^[22], 他们发现缺乏 H-NS 会导致鞭毛瘫痪, 这种缺陷可以通过 YcgR 中的突变来抑制, 表明 YcgR 与细菌鞭毛运动息息相关。还有研究显示, 一方面 YcgR 与 MotA 直接相互作用, 且与 c-di-GMP 的细胞浓度相关; 另一方面, YcgR 与 FliG 和 FliM 相互作用, 并且在 c-di-GMP 存在下相互作用变得更强, 推测 YcgR-c-di-GMP 复合物可能通过干扰 Mot 蛋白与 FliG 的适当关联而干扰运动旋转^[12,18,23]。因此, 研究 YcgR 与第二信使分子 c-di-GMP 调节鞭毛马达速度的详细机理, 对于了解鼠伤寒沙门氏菌如何激活并控制细胞运动的机制有非常重要的意义。

目前针对鼠伤寒沙门氏菌 c-di-GMP 结合蛋白 YcgR 的结构和功能的研究是基于霍乱弧菌 YcgR 样蛋白 VCA0042/PilZD 的晶体结构^[15], 两者之间序列相似性较低, 可信度有待验证。因此获得高纯度的 YcgR 蛋白, 并对其生物物理性质以及 c-di-GMP 结合活性进行表征, 对于进一步确定 YcgR 的结构以及阐明 c-di-GMP 如何通过结合 YcgR 而减缓细菌运动速度的分子机制是非常必要的, 同时也为后续研究鼠伤寒沙门氏菌从运动向静止状态过度并侵染宿主的调控机制提供重要依据, 并为鼠伤寒沙门氏菌抗感染的药物的研发和治疗提供新的手段和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium* IR715), 大肠杆菌 (*Escherichia coli* DH5 α) 和大肠杆菌 [*Escherichia coli* BL21 Star (DE3)] 均由笔者实验室保存; 原核表达质粒 pET-28a 由西安交通大学生命学院馈赠。

1.1.2 主要试剂和仪器

DL10000 核酸 Marker, 限制性内切酶 *Nco* I 和 *Eco*R I 均购自宝生物工程(大连)有限公司; 蛋白质预染 Marker26616、T4 连接酶、蛋白质 Thermal Shift 试剂盒均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; DNA 高保真聚合酶购自南京诺唯赞生物科技有限公司; c-di-GMP、c-di-AMP、咪唑等化学试剂均购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 细菌全基因组试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒和质粒小提试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司; 引物的合成和质粒的测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成; His-tag 蛋白纯化磁珠购自苏州海狸生物医学工程有限公司。

PCR 热循环仪, Eppendorf 公司; 琼脂糖水平电泳仪、蛋白垂直电泳仪、荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司; AKTA 蛋白纯化系统、Ni-NTA 镍离子亲和层析柱、Superdex 75 10/300 GL 体积排阻色谱, GE 公司; 圆二色光谱仪(CD), 英国 Applied Photophysics 公司; 等温滴定量热仪 ITC, 马尔文公司。

1.2 *ycgR* 基因的克隆及原核表达载体的构建

用细菌全基因组提取试剂盒提取培养过夜的鼠伤寒沙门氏菌的总 DNA, 并以总 DNA 为模板, 设计上下游引物 5'-CCCATGGGCCATCATCATCA TCATCACAGTGGTTACAATGAGCAGTTCCTGAA-3' (下划线为 *Nco* I 酶切位点, 在 N 端设计了 6 \times His 标签) 和 5'-GGAATTCTTATTCTCGCACTTT ATTCGCTCTT-3' (下划线为 *Eco*R I 酶切位点) 扩增 *ycgR* 基因, PCR 反应体系 (50 μ L): 5 \times Buffer 10 μ L, 10 mmol/L dNTPs 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L (约 100 ng),

10 $\mu\text{mol/L}$ 的上、下游引物各 2 μL , ddH₂O 33 μL , 高保真酶 1 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。用 DNA 纯化试剂盒回收 PCR 产物并用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Eco*R I 进行双酶切后插入到 pET-28a 表达载体上, 转化 *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) 感受态细胞, 将菌体涂布于含 50 $\mu\text{g/mL}$ Kan^r 的 LB 平板(g/L: 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 琼脂粉 15.0), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。挑取单菌落, 以 T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') 和 T7ter (5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3') 为引物做菌落 PCR, 选择阳性结果的克隆, 提取质粒送至苏州金唯智生物科技有限公司测序, 进一步确定插入的目的基因序列是否正确。

1.3 YcgR 蛋白的表达及小量纯化

将培养过夜的细菌按照 1% 接种量接种至 50 mL 含 50 $\mu\text{g/mL}$ Kan^r 的 LB 液体培养基中(LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 下同), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 下诱导 8 h, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 加入 5 mL 预冷的 10 mmol/L PBS 重悬后对菌体进行超声破碎(300 W, 工作 1 s, 间隔 1 s, 共 10 min), 破碎后的菌液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 r/min 下离心 20 min, 收集上清; 利用镍离子修饰的磁珠将上清中的含有 His 标签的目的蛋白纯化出来, 具体方法参见 His-tag 蛋白纯化磁珠使用说明书。12% SDS-PAGE 电泳检测, 考马斯亮蓝染色, 检验蛋白的表达和可溶性。

1.4 鼠伤寒沙门氏菌 YcgR 蛋白的分离纯化

将过夜培养的细菌按照 1% 接种量接种至 1 L 的 LB 培养基中进行诱导表达, 诱导表达条件按照 1.3 中 YcgR 蛋白的诱导表达条件执行。诱导表达后的菌体经离心收集后, 重悬于 30 mL 10 mmol/L PBS 中, 加入 PMSF (终浓度 1 mmol/L), 在 0 $^{\circ}\text{C}$ 超声破碎(300 W, 工作 1 s, 间隔 1 s, 共 30 min), 4 $^{\circ}\text{C}$ 、16 000 r/min 离心 20 min, 收集上清备用。用 AKTA 蛋白纯化系统对上清中的目的蛋白进行

纯化, 得到目的蛋白粗品。粗品用 10 kD 的超滤管 (Merck Millipore) 浓缩至 1 mL 后, 进一步用 Superdex 75 10/300 GL 体积排阻色谱纯化: 将预装柱用 20 mmol/L PBS (pH 7.4) 平衡, 上样体积 1 mL, 观察出峰位置并收集出峰的穿出蛋白。用分光光度计在 280 nm 处测定收集样品蛋白浓度。将收集的蛋白样品用 12% SDS-PAGE 电泳检测, 考马斯亮蓝染色, 检验蛋白分离纯化效果。

1.5 YcgR 蛋白的结构预测及圆二色光谱测定

1.5.1 结构预测

根据已知的 YcgR 蛋白质序列, 通过利用结构已知的 YcgR 蛋白质家族成员——来自铜绿假单胞菌的 PP4397^[16] 预测鼠伤寒沙门氏菌 YcgR 蛋白的结构, 在 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 建立 YcgR 蛋白的模拟结构, 通过对 YcgR 和 PP4397 的序列进行比对, 同时在 PyMOL 软件分析两者结构上的差异, 建立 YcgR 序列与相应结构和功能之间的联系。

1.5.2 圆二色光谱测定

配制 2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 三个浓度的 YcgR 蛋白溶液于 20 mmol/L PBS 中, 分别将蛋白溶液注入 1 cm 的石英比色皿中, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下, 用圆二色光谱仪 CD 对样品在 190–250 nm 范围内进行扫描, 单位扫描间隔设置为 1 nm, 单位扫描时间为 8 s, 对扫描的结构进行分析, 计算蛋白中 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲的含量, 分析 YcgR 蛋白结构的稳定性。

1.6 YcgR 与 c-di-GMP 的热力学结合参数的测定

1.6.1 等温滴定量热法(ITC)

ITC 用 Microcal ITC200 calorimeter 完成, 反应在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下进行, YcgR 蛋白样品和 c-di-GMP 样品均将缓冲液置换到 PBS 中, 蛋白质样品通过 NanoDrop 分光光度计进行定量, 浓度在 10–15 $\mu\text{mol/L}$, c-di-GMP 浓度通过称量定量, 浓度在 10–20 $\mu\text{mol/L}$, ITC 实验通过将 40 μL c-di-GMP 注入 250 μL YcgR 蛋白溶液中, 开始第一次滴入 0.4 μL c-di-GMP, 随后滴入 2 μL c-di-GMP, 每滴的间隔时间为 120 s, 实验重复 3 次。数据用 MicroCal iTC200 Calorimeter 自带的 Origin 软件处理。

1.6.2 蛋白质热转移技术(Protein thermal shift)测定

蛋白质热转移实验使用荧光定量 PCR 仪。10 μ L 反应体系中, 10 μ mol/L *YcgR* 蛋白分别与不同浓度 (0、2、5、10、25、50、100、200 μ mol/L) 的 *c-di-GMP* 和 *c-di-AMP* 进行孵育, 每组设置 3 个平行样。加入 Protein thermal shift 试剂盒染料用来追踪蛋白质的热变性, 随着温度的持续上升, 由荧光监测器 (COD) 同步记录每个孔中的荧光值变化, 获得蛋白质在不同浓度 *c-di-GMP* 和 *c-di-AMP* 溶液中随温度变化的溶解曲线。记录温度的范围为 25–75 $^{\circ}$ C。数据用 Origin 软件进行简单分析。

2 结果与分析

2.1 *ycgR* 基因的 PCR 扩增及重组载体的鉴定

以鼠伤寒沙门氏菌总 DNA 为模板, 用 PCR 扩增片段后, 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测发现目的片段的大小与 *ycgR* 基因的理论大小 (735 bp) 一致, 如图 1 所示。对构建的重组表达载体的单克隆细菌进行菌落 PCR 检验, 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测确定阳性单克隆细菌 1、2、4、5 (图 2), 目的条带大小约为 1 000 bp, 经测序证明了重组质粒构建成功。

2.2 *YcgR* 蛋白的诱导表达和小量纯化分析

将诱导表达 8 h 的蛋白用带有镍离子的磁珠进行小量纯化, 对其可溶性进行分析, 最后样品经 SDS-PAGE 检测, 如图 3 所示, 在 25–35 kD 之间有一条明显的表达条带, 大小约为 28 kD, 与 *YcgR*

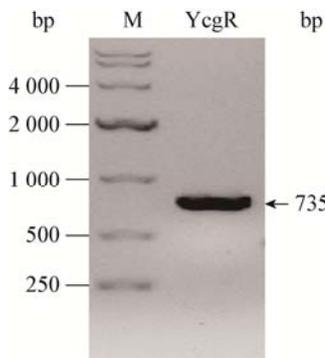


图 1 *ycgR* 基因的 PCR 扩增结果
Figure 1 Production of *ycgR* gene amplified by PCR

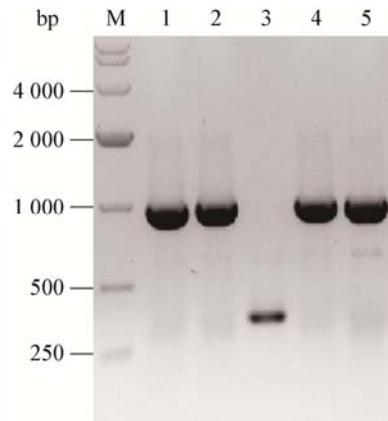


图 2 pET-28a-ycgR 单克隆细菌的菌落 PCR 结果
Figure 2 Colony PCR results of pET-28a-ycgR monoclonal bacteria
注: M: DL10000 DNA 标准条带; 1–5: 代表不同的单克隆菌落。
Note: M: DL10000 DNA marker; 1–5: Represent different monoclonal bacteria.

蛋白的大小相符, 且蛋白部分存在于上清之中; 利用 *YcgR* 融合蛋白的 His 标签, 用镍磁珠进行小量纯化, 在图 3 中 E 泳道看到一个 28 kD 的蛋白条带, 证明了该蛋白为我们所设计的 *YcgR* 融合蛋白。

2.3 *YcgR* 蛋白的分离纯化

诱导得到的 *YcgR* 蛋白通过 Ni-NTA 镍离子亲和层析柱和体积排阻色谱两步纯化, 最终获得高纯度的 *YcgR* 蛋白, 纯化的蛋白经 SDS-PAGE 检测。在

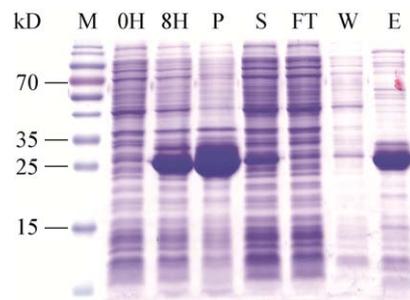


图 3 SDS-PAGE 分析原核表达产物 *YcgR* 蛋白
Figure 3 SDS-PAGE analysis of prokaryotic expression product *YcgR* protein
注: M: 预染的蛋白质标准条带; 0H: 未诱导的细菌; 8H: 诱导后的细菌; P: 破碎离心后的沉淀; S: 破碎离心后的上清; FT: 纯化过程中的穿液; W: 洗涤液; E: 洗脱液。
Note: M: Prestained protein marker; 0H: Uninduced bacteria; 8H: Induced bacteria; P: The pellet obtained by centrifugation; S: The supernatant obtained by centrifugation; FT: Flow through; W: The wash buffer; E: Elution buffer.

体积排阻色谱 Superdex 75 10/300 GL 上显示(图 4A), YcgR 蛋白的出峰时间在 11.3 mL, 理论计算的分子量为 50 kD 左右, 在 SDS-PAGE 上显示蛋白的大小约为 28 kD (图 4B), 且纯度超过 90%, 推测 YcgR 蛋白在溶液状态下是处于二聚体的状态。

2.4 YcgR 蛋白结构预测及圆二色光谱测定

根据 YcgR 蛋白质序列, 在 SWISS-MODEL 网站上同源建模的方法最终预测出该蛋白质的三级结构图。对比 YcgR 和其同源家族蛋白 PP4397 的蛋白质序列(图 5A)以及对比两者的蛋白质结构

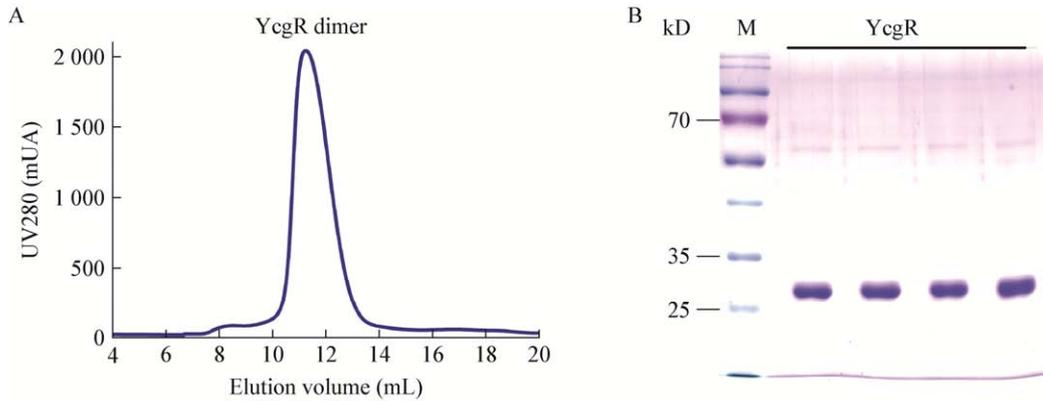


图 4 YcgR 蛋白纯化及 SDS-PAGE 分析

Figure 4 YcgR protein purification and SDS-PAGE analysis

注: A: 体积排阻色谱纯化的结果; B: SDS-PAGE 检测纯化的蛋白样品。

Note: A: Size exclusion chromatography purification result; B: SDS-PAGE analysis of purified protein samples.

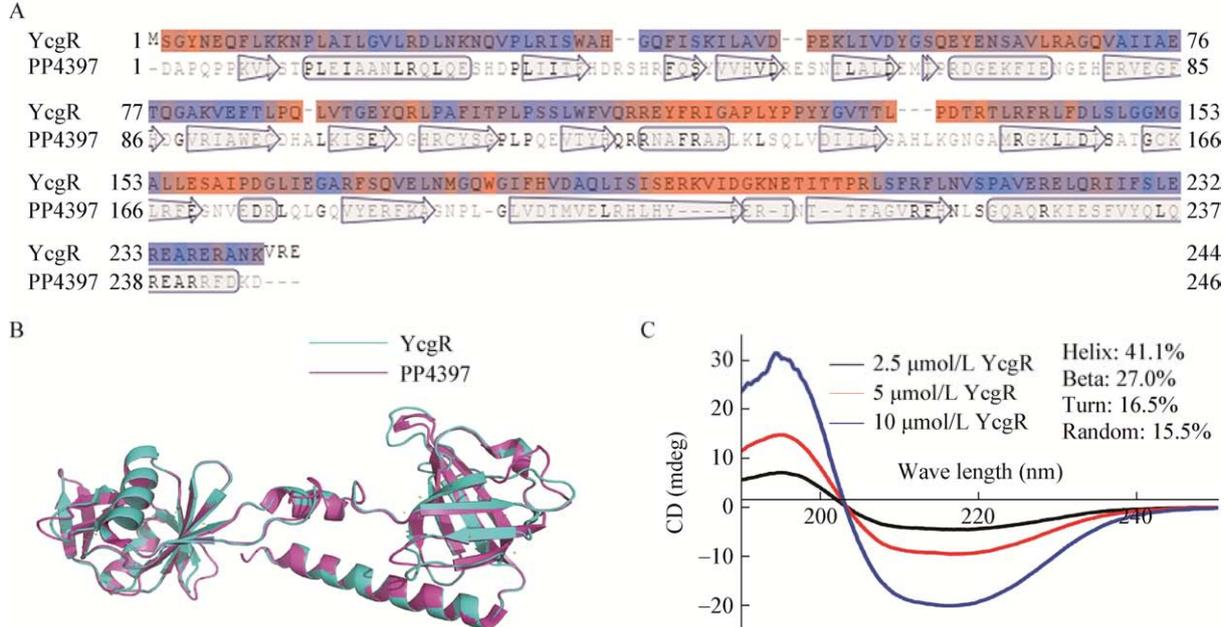


图 5 YcgR 蛋白序列比对和结构预测及圆二色光谱测定

Figure 5 YcgR protein sequence alignment and structural prediction and circular dichroism determination

注: A: YcgR 与 PP4397 序列的比对结果, 箭头代表 β -折叠, 圆柱体代表 β -螺旋; B: YcgR 预测的结构与 PP4397 结构的比对结果, 蓝色代表 YcgR, 紫色代表 PP4397; C: 圆二色光谱测定 YcgR 的二级结构, 不同的曲线代表不同浓度的 YcgR 蛋白。

Note: A: YcgR protein sequence alignment with PP4397, arrows represent β -sheet, cylinders represent α -Helix; B: Structural prediction and compared with the structure of the PP4397 protein, blue represents YcgR, purple represents PP4397; C: Circular dichroism determination, the different curve represent different concentrations of YcgR protein.

(图 5B), 可以发现其序列的相似性较低, 但是在结构上具有高度的相似性, 箭头代表 β -折叠、圆柱形代表 α -螺旋, 根据预测的 YcgR 蛋白质结构和同源家族蛋白 PP4397 结构进行比对, 发现 YcgR 由 2 个结构域组成: 未知功能的 N 末端域和 C 末端 PilZ 结构域, PilZ 结构域可能是 c-di-GMP 的效应器。

圆二色光谱仪的测定结果显示, 表达纯化得到的 YcgR 蛋白具有稳定的二级结构, 如图 5C, YcgR 蛋白在 195 nm (代表 β -折叠) 和 222 nm (代表 α -螺旋) 处有显著的吸收峰, 通过计算分析, 其 α -螺旋含量大约在 41.1%, β -折叠约为 27.0%, β -转角为 16.5%, 无规则卷曲大约为 15.5%。

圆二色光谱测定所得到的 YcgR 蛋白的二级结构组成和预测的 YcgR 蛋白结构基本吻合, 证明所纯化得到的蛋白是具有稳定构象的蛋白。

2.5 YcgR 与 c-di-GMP 的热力学结合参数的测定

利用等温滴定量热法 (ITC) 测定 YcgR 与 c-di-GMP 之间反应中的热量变化, 通过拟合滴定曲线分析两者之间的热力学结合参数, 如图 6A, 1 个 YcgR 二聚体结合 2 个 c-di-GMP 分子, 两者之间的 K_d 值为 50 nmol/L、 ΔH 为 -18.3 kcal/mol、 ΔS 为 -27.8 cal/(mol·deg), 可以看出 YcgR 与 c-di-GMP 之间有很强的结合。

Protein thermal shift 分析 YcgR 与 c-di-GMP (图 6B) 和 c-di-AMP (图 6C) 的结合, 利用 RT-PCR 仪测定 YcgR 蛋白与不同浓度的 c-di-GMP 和 c-di-AMP 孵育的溶解曲线, 由图 6B 可以看出, YcgR 蛋白与不同浓度的 c-di-GMP 孵育, 随着 c-di-GMP 浓度的增加 (从 0 μ mol/L 到 200 μ mol/L), YcgR 蛋白的溶解温度从 40 $^{\circ}$ C 左右逐渐提高到 60 $^{\circ}$ C 左右, 其蛋白质

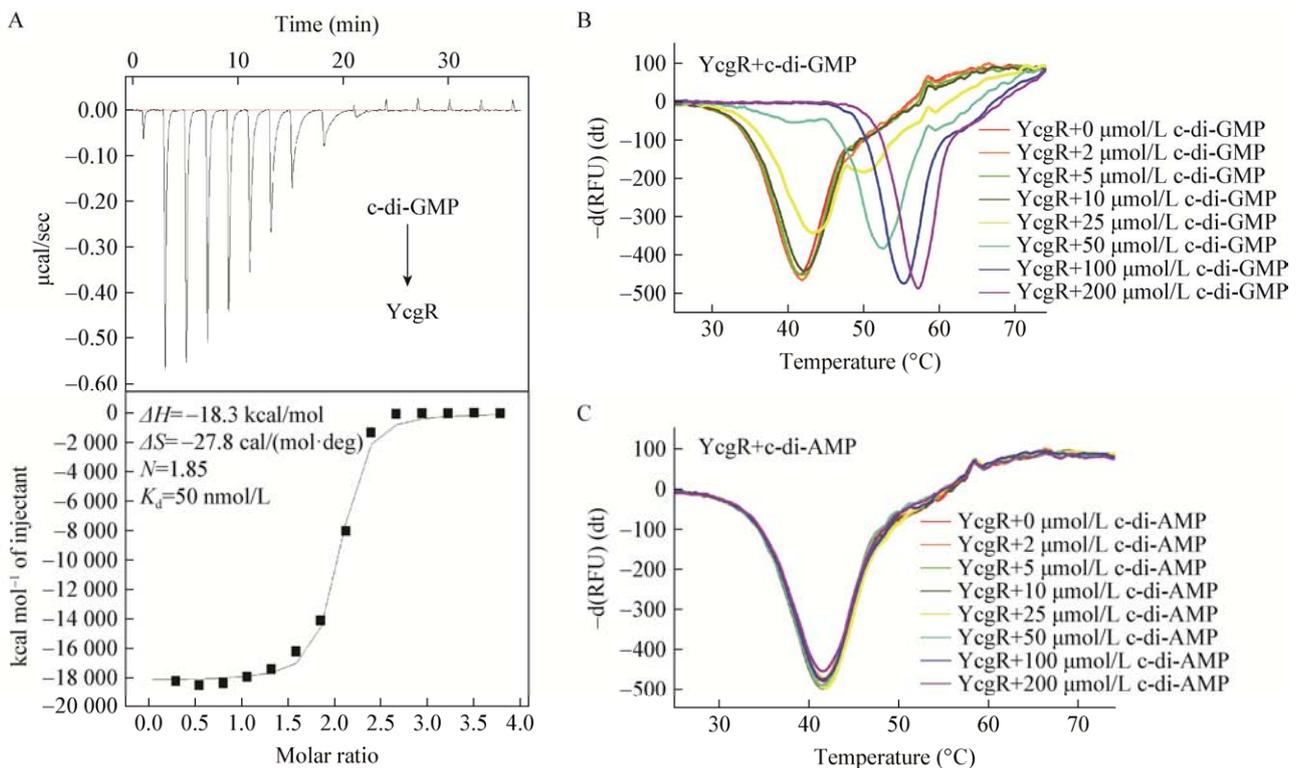


图 6 YcgR 与 c-di-GMP 的 ITC 和 Thermal shift 结果

Figure 6 ITC and thermal shift results

注: A: YcgR 与 c-di-GMP 的 ITC 结果, 拟合曲线及相关参数; B、C: YcgR 与 c-di-GMP、c-di-AMP 的蛋白质热转移实验结果, 不同的曲线代表不同浓度的 c-di-GMP 和 c-di-AMP。

Note: A: ITC results of YcgR with c-di-GMP, fitted titration curves and parameters; B, C: Protein thermal shift of YcgR with c-di-GMP and c-di-AMP, the different curve represents different concentrations of c-di-GMP and c-di-AMP.

的结构更加稳定, YcgR 蛋白与 c-di-GMP 有结合; 图 6C 显示, YcgR 蛋白与不同浓度的 c-di-AMP 孵育, 其溶解曲线没有变化, 意味着 YcgR 蛋白不与 YcgR 蛋白结合, Protein thermal shift 结果说明 YcgR 蛋白特异性地与 c-di-GMP 结合而不与 c-di-AMP 结合。

3 讨论与结论

鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 是一种常见的肠道致病菌, YcgR 蛋白是沙门氏菌中一类依赖 c-di-GMP 的细菌鞭毛运动调节蛋白, 通过与 c-di-GMP 结合从而调节细菌从浮游生长向静止状态的生物膜形成过渡, 这种状态有助于细菌在非宿主环境中生存, 传播给新宿主, 并在适当的宿主中建立和产生持续性的感染^[4-5]。

本研究以鼠伤寒沙门氏菌基因组 DNA 为模板、以 pET-28a 为载体, 构建了含有 6×His 标签蛋白的重组质粒 pET-28a-ycgR。并将该质粒转入表达菌 *E. coli* BL21 Star (DE3) 中, 在 OD_{600} 为 0.8、1 mmol/L IPTG、28 °C、200 r/min 诱导 8 h 的条件下表达 YcgR 蛋白, 经菌体破碎离心, Ni-NTA 镍离子亲和层析柱和体积排阻色谱两步纯化蛋白, 再经 SDS-PAGE 检验, 证明了我们获得了高纯度的 YcgR 蛋白, 为后续的蛋白质的结构与功能的研究奠定基础。

将已有的 YcgR 蛋白质序列和同源家族蛋白进行比对建立蛋白质模型, 发现 YcgR 由 2 个结构域组成: N 末端的未知功能结构域和 C 末端的 PilZ 结构域。其中 PilZ 结构域可以在体外以足够高的亲和力结合 c-di-GMP, 使其能够响应细胞内 c-di-GMP 水平的微小变化。这种结构域组织在大量的蛋白细菌中是保守的^[13]。推测高 c-di-GMP 水平促进生物膜细胞外基质的粘附素和胞外多糖的产生并抑制细菌鞭毛的运动。圆二色光谱仪的结果也显示纯化获得 YcgR 蛋白具有稳定的二级结构, 其计算分析得出 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲的含量也符合模拟预测的蛋白质结构的理论含

量。等温滴定量热法(ITC)和 Protein thermal shift 的实验数据表明 YcgR 蛋白的溶解温度随 c-di-GMP 浓度的增加而增高, 而 c-di-AMP 浓度的变化对 YcgR 蛋白的溶解温度没有影响, 证明了 YcgR 蛋白能特异性地与 c-di-GMP 结合, ITC 的结果也显示两者之间较强的结合能力。推测在细菌体内, 高浓度的 c-di-GMP 通过和 YcgR 结合来抑制细菌鞭毛马达的运动, 进而使细菌从浮游状态向静止状态转变, 这一过程有利于细菌对宿主的侵袭, 导致宿主感染。YcgR 蛋白结构上的特性以及其与 c-di-GMP 结合抑制细菌运动的功能, 使得 YcgR 蛋白能够作为一个很有潜力的抗菌抗感染药物研发的靶点蛋白。为了进一步研究 YcgR 蛋白与细菌信号分子 c-di-GMP 调控鞭毛运动的机制, 在本研究结果的基础上, 下一步有必要对 YcgR 蛋白和 YcgR 与 c-di-GMP 复合物进行结晶实验, 解析其原子水平的空间结构, 从而发掘 YcgR 与 c-di-GMP 结合的关键位点。

REFERENCES

- [1] Feng F, Xie ZW, Zeng MH. Studies on detection of *Salmonella typhimurium* in food by multiplex polymerase chain methods[J]. China Biotechnology, 2011, 31(1): 65-69 (in Chinese)
冯飞, 谢振文, 曾慕衡. 鼠伤寒沙门氏菌多重 PCR 检测方法的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(1): 65-69
- [2] Asahara T, Shimizu K, Takada T, et al. Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota against lethal infection with multi-drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in mice[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(1): 163-173
- [3] Handeland K, Refsum T, Johansen BS, et al. Prevalence of *Salmonella* Typhimurium infection in Norwegian hedgehog populations associated with two human disease outbreaks[J]. Epidemiology and Infection, 2002, 128(3): 523-527
- [4] Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, et al. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication[J]. Food Research International, 2012, 45(2): 502-531
- [5] Lai SL, Hou H, Jiang W. Bacterial motility and its role during initial stage of pathogenesis[J]. Journal of Microbiology, 2006, 26(5): 68-70 (in Chinese)
赖世龙, 侯浩, 姜伟. 细菌的运动性及其在致病初期过程中的作用[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(5): 68-70
- [6] Lo YL, Shen L, Chang CH, et al. Regulation of motility and phenazine pigment production by FliA is cyclic-di-GMP dependent in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0155397
- [7] Na LX, Yang ZJ. Activity of cyclic diguanylate (c-di-GMP) in

- bacteria and the study of its derivatives[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2012, 47(3): 307-312 (in Chinese)
- 那路新, 杨振军. 环二鸟苷酸(c-di-GMP)在微生物体内的作用及其类似物的研究[J]. *药学报*, 2012, 47(3): 307-312
- [8] Purcell EB, Tamayo R. Cyclic diguanylate signaling in Gram-positive bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2016, 40(5): 753-773
- [9] Hengge R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(4): 263-273
- [10] Wolfe AJ, Visick KL. Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(2): 463-475
- [11] Le Guyon S, Simm R, Rehn M, et al. Dissecting the cyclic di-guanylate monophosphate signalling network regulating motility in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(4): 1310-1320
- [12] Fang X, Ahmad I, Blanka A, et al. GIL, a new c-di-GMP-binding protein domain involved in regulation of cellulose synthesis in enterobacteria[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 93(3): 439-452
- [13] Amikam D, Galperin MY. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(1): 3-6
- [14] Pitzer JE, Sultan SZ, Hayakawa Y, et al. Analysis of the *Borrelia burgdorferi* cyclic-di-GMP binding protein PlzA reveals a role in motility and virulence[J]. *Infection and Immunity*, 2011, 79(5): 1815-1825
- [15] Benach J, Swaminathan SS, Tamayo R, et al. The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains[J]. *The EMBO Journal*, 2007, 26(24): 5153-5166
- [16] Ko J, Ryu KS, Kim H, et al. Structure of PP4397 reveals the molecular basis for different c-di-GMP binding modes by PilZ domain proteins[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 398(1): 97-110
- [17] Deng GH, Xu QW, Liu JK, et al. Bacterial flagellar motor: a splendid molecular motor [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2000, 27(6): 612-615 (in Chinese)
- 邓国宏, 徐启旺, 刘俊康, 等. 细菌鞭毛马达——一种卓越的分子机器[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2000, 27(6): 612-615
- [18] Mckee RW, Kariisa A, Mudrak B, et al. A systematic analysis of the *in vitro* and *in vivo* functions of the HD-GYP domain proteins of *Vibrio cholerae*[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 272
- [19] Sircar R, Greenswag AR, Bilwes AM, et al. Structure and activity of the flagellar rotor protein fliY: a member of the cheC phosphatase family[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(19): 13493-13502
- [20] Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, et al. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(17): 6712-6717
- [21] Boehm A, Kaiser M, Li H, et al. Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity[J]. *Cell*, 2010, 141(1): 107-116
- [22] Ko M, Park C. Two novel flagellar components and H-NS are involved in the motor function of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 303(3): 371-382
- [23] Paul K, Nieto V, Carlquist WC, et al. The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a “backstop brake” mechanism[J]. *Molecular Cell*, 2010, 9(1): 128-139