

研究报告

金黄色葡萄球菌 AgrA/C 双组分信号转导模型的构建与功能评价

权春善^{1*} 张旭宁² 金黎明¹ 张丽影¹ 赵晶¹ 范圣第¹

(1. 大连民族大学生命科学院 辽宁 大连 116600)

(2. 大连工业大学生物工程学院 辽宁 大连 116034)

摘要:【背景】抗生素的无序使用加剧了耐药性金黄色葡萄球菌超级菌株的出现,由其引发的感染已成为最难解决的感染性疾患。在生物体系外构建 AgrA/C 双组分系统的跨膜信号转导过程,对解决金黄色葡萄球菌的耐药性问题和发现新型抗菌药物具有重要的研究意义。【目的】人工模拟构建金黄色葡萄球菌 AgrA/C 双组分信号转导模型,为生物体外研究金黄色葡萄球菌双组分信号转导的机制及以其为靶点的药物筛选提供新途径。【方法】在大肠杆菌宿主细胞中大量表达 AgrA 和 AgrC 蛋白,利用亲和层析和分子筛凝胶层析对其进行分离纯化,利用非放射性凝胶阻滞实验(EMSA)检测 AgrA 蛋白活性,并检测 AgrC 激酶活性;进而利用脂质体介导法在体外组装 AgrA/C 双组分信号转导模型,应用 EMSA 方法进行评价。【结果】分离纯化得到 AgrA 和 AgrC 蛋白,二者纯度均达到 90%以上,均具有活性。在生物体系外构建了金黄色葡萄球菌 AgrA/C 双组分信号转导模型,该系统可增强 AgrA 对 DNA 的延滞作用,具有信号传递功能。【结论】初步构建 AgrA/C 双组分信号转导模型,该模型具有信号传递能力,有望作为针对金黄色葡萄球菌开发新型抗菌药物的筛选平台。

关键词: 金黄色葡萄球菌, AgrA/C 双组分信号转导系统, 凝胶阻滞实验, 群体感应

Construction and evaluation of AgrA/C two component signal transduction model of *Staphylococcus aureus*

QUAN Chun-Shan^{1*} ZHANG Xu-Ning² JIN Li-Ming¹ ZHANG Li-Ying¹
ZHAO Jing¹ FAN Sheng-Di¹

(1. College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian, Liaoning 116600, China)

(2. School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

Abstract: [Background] The abuse of antibiotics accelerated the emergence of antibiotic-resistant of *Staphylococcus aureus*, and the infections caused by these superbugs have become one of the most

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (21272031); Fundamental Research Fund for Central University of China (DC201502020201)

*Corresponding author: Tel: 86-411-87656219; E-mail: mikyeken@dlnu.edu.cn

Received: May 10, 2017; Accepted: September 21, 2017; Published online (www.cnki.net): October 20, 2017

基金项目: 国家自然科学基金(21272031); 中央高校自主科研基金资助项目(DC201502020201)

*通信作者: Tel: 86-411-87656219; E-mail: mikyeken@dlnu.edu.cn

收稿日期: 2017-05-10; 接受日期: 2017-09-21; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-10-20

challenging tasks in clinic. Reconstruction of the transmembrane signal transduction process of AgrA/C pathway *in vitro* will be very helpful in solving the problem of antibiotic resistance in *S. aureus* and developing new antibiotics against these bacteria. **[Objective]** To realize *in vitro* construction of an AgrA/C two component signal transduction model for investigating mechanism of two component signal transduction in *S. aureus* and drug screening. **[Methods]** AgrA and AgrC proteins were expressed in *Escherichia coli* C43(DE3) and purified by affinity and size exclusion chromatography, and then their biological activities were analyzed. The AgrA/C two component signal transduction model was constructed *in vitro* using detergent-mediated method and the validity of the model was verified through the electrophoretic mobility shift assay (EMSA). **[Results]** The purity of AgrA and AgrC was over 90%. AgrA protein can bind to the target DNA and AgrC has the kinase activity. The AgrA/C two component signal transduction model was constructed *in vitro*. The model could enhance the delay of DNA mobility shift by AgrA, indicating the artificial simulation model can transfer signal. **[Conclusion]** We designed and constructed the AgrA/C two component signal transduction model *in vitro* successfully. This model system is expected to be a screening platform for new antibacterial drugs targeting *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, AgrA/C two component signal transduction model, EMSA, Quorum sensing

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种极具危害性的人类病原菌,可引起皮肤、口腔以及鼻腔粘膜等组织局部化脓感染,也可引起肺炎、伪膜性肠炎、心包炎以及尿路感染等,若不及时治疗常引起败血症、脓毒症等全身感染导致死亡^[1]。但近年来由于抗生素的过度和无序使用,金黄色葡萄球菌等多种人类致病细菌对多种抗生素产生了严重的抗药性,给疾病防治带来了严峻的挑战,如何控制超级细菌已成为全球医疗领域的难题^[2]。因此,开发抗菌药物的新方法、新手段及寻求新药物靶点已成为医药领域关注的焦点和迫切需要。

金黄色葡萄球菌在侵染宿主过程中产生溶血素、杀白细胞毒素、表皮溶解毒素、肠毒素等多种毒力因子,这些毒力因子是其致病的主要原因。毒力因子的表达受到细胞内不同调节系统的控制,同时这些调节系统之间也存在着复杂的相互作用关系^[3]。研究表明,金黄色葡萄球菌毒力因子的表达主要由附属基因调节(Accessory gene regulator, agr)系统调控。agr系统是一个全局调控因子,受群体感应(Quorum sensing, QS)机制调节,也是典型的双组分信号转导系统。agr系统包含2个启动子P2和P3, RNAII是启动子P2的效应器, RNAIII是启动子P3的效应器。RNAII包含AgrB、AgrD、

AgrC和AgrA 4个开放阅读框, AgrD是信号分子自诱导肽(Autoinducing peptides, AIPs)的前体,经膜蛋白AgrB加工后,形成有活性的AIP分泌到胞外。AgrC是一种跨膜受体组氨酸蛋白激酶,与反应调节因子AgrA组成一个双组分信号转导系统(Two component signal transduction system, TCSTS)。AgrC是组氨酸蛋白激酶大家族中的一类,负责接收胞外AIP信号的刺激,调节菌体自身各种生化反应和细胞行为。当外界环境中的AIP浓度达到一个阈值, AgrC发生依赖于ATP的自我磷酸化,并将磷酸基团转移至反应调节因子AgrA,从而激活AgrA,激活后的AgrA可以与P2-P3之间的DNA区域特异性结合,从而调节效应器RNAII和RNAIII的转录与表达^[4-6]。

传统的抗生素通过干扰细胞壁的合成、损伤细胞膜、抑制关键蛋白和DNA的合成而直接杀死病原菌细胞。这种“生与死”的选择压力极大地加速了微生物耐药性的进化,随着抗生素的大规模使用,很多病原菌对抗生素产生了很强的耐药性。以AgrA/C双组分信号系统为靶点开发的信号转导抑制剂则能够阻断与微生物致病性和耐药性相关的信号转导通路,从而降低病原微生物的感染。由于信号转导抑制剂不影响病原菌的生长能力,不易产

生耐药性,是现代新型抗菌药物创新开发的前沿方向。从药物化学角度来看,靶向金黄色葡萄球菌 AgrA/C 双组分信号系统的抑制剂可分为 4 类:(1) AIP 竞争性抑制剂,可与 AgrC 胞外域结合,从而阻断信号通路;(2) AgrC 激酶抑制剂,可与 AgrC 胞内域结合,从而阻断信号通路;(3) AgrA-DNA 相互作用抑制剂;(4) RNAIII 表达抑制剂^[7-8]。其中,AIP 抑制剂由于能够从源头上阻断信号通路,被视为最有前景的抑制剂,也是研究的热点,Blackwell 等合成了多种 AIP 结构类似物。目前,检测这些化合物生物活性的方法是利用细胞内构建的报告基因来测定,无法直接证明化合物是否靶向 AgrC 蛋白,是否作用于其胞外域^[9-10]。因此,急需构建一种简单、直接的药物筛选模型。若能在体外构建一个人工模拟 AgrA/C 双组分信号转导模型,将为在生物体外研究金黄色葡萄球菌双组分信号转导的机制,以及以其为靶点的药物筛选提供很大的便利。

本研究拟对 AgrA 和 AgrC 蛋白进行表达纯化及活性分析,进而利用脂质体介导法在体外组装 AgrA/C 双组分信号转导系统模型,并利用 EMSA 实验对其做出评价。该研究对于建立针对金黄色葡萄球菌的新型抗菌药物筛选平台具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及培养基

金黄色葡萄球菌 ATCC6538 购自中国工业生物菌种保藏中心。

NB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.00, 牛肉膏 3.00, 氯化钠 5.00, pH 7.4。

TBE 培养基(g/L): 酵母提取物 24.00, 蛋白胨 12.00, 甘油 4.00, MgSO₄ 0.24, KH₂PO₄ 2.70, K₂HPO₄ 18.20, pH 7.0。

32Y 培养基(g/L): 酵母提取物 32.00, 蛋白胨 8.00, 氯化钠 5.80, 卡那霉素 0.05, 溶解在 10 mol/L Tris-HCl (pH 7.6) 缓冲液中。

1.1.2 主要试剂和仪器

携带 pET-28a(+)-AgrC 和 pET-28a(+)-AgrA 重

组质粒的大肠杆菌(*Escherichia coli*) C43(DE3)由本实验室构建并保存。Luminescent Kinase Assay Kit 购自 Promega 公司; HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid]、ATP、DOPC (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)、DPPA (Diphenylphosphoryl azide)、LDAO (Lauryldimethylamine oxide)、Cholesterol 购自 Avanti 公司; IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 蛋白酶抑制剂 Pefabloc SC 购自 Roche 公司; Bio-BeadsTM SM-2 Resin 购自 Bio-Rad 公司; Ni-SepharoseTM High Performance 购自 GE 公司; AIP 信号分子由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。层析柱 HiLoadTM 16/600 SuperdexTM 200 pg 购自 GE 公司; 荧光发光微孔检测仪购自 BioTek 公司; 高压细胞破碎仪购自广州聚能生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 AgrA 蛋白的表达与纯化

将携带 pET-28a(+)-AgrA 重组质粒的大肠杆菌接种至含有氯霉素和卡那霉素的 TBE 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养。待菌体密度达到 OD₆₀₀ 为 0.5 时, 加入终浓度为 0.5 mol/L 的 IPTG, 20 °C、222 r/min 诱导表达 22 h, 4 °C、8 000×g 离心 10 min 收集菌体, 并用 PBS 缓冲液(137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4) 洗涤菌体 3 次后再悬浮, 使菌体最终密度达到 100 mg/mL。向菌液中加入终浓度为 1 mol/L MgCl₂、20 mol/L 咪唑、蛋白酶抑制剂(每片 10 mL)和 100 U/mL DNase, 在冰上孵育 1 h, 在 4 °C、10⁸ Pa 压力下, 用高压细胞破碎仪破碎菌体, 然后 24 000×g 离心 25 min, 收集上清。应用金属离子亲和层析法(Immobilized metal affinity chromatography, IMAC)对蛋白粗提液进行纯化。将 5 mL 已处理好的填料(Ni-SepharoseTM High Performance)灌入低压层析柱(Bio-Rad, 2.5 cm×10 cm)中, 用 Washing buffer (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, 10% 甘油, 50 mmol/L

咪唑, pH 7.4)平衡 10 min, 随后加入 10 mL 蛋白粗提液, 4 °C、200 r/min 轻摇 5 min, 使目的蛋白与填料充分结合, 利用 4 倍柱体积的 Washing buffer 对杂蛋白进行洗脱, 洗去未结合的非特异性蛋白。最后用 Elution buffer (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, 10% 甘油, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.4)将目的蛋白洗脱出来。IMAC 纯化后的目的蛋白再利用分子筛层析法(Size exclusion chromatography, SEC)进行纯化, 所用层析柱为 HiLoad™ 16/600 Superdex™ 200 pg, 流动相组成为: 100 mmol/L NaCl, 10% 甘油(体积比), 10 mmol/L HEPES, pH 7.4。

1.2.2 AgrC 蛋白的表达与纯化

将携带 pET-28a(+)-AgrC 质粒的 *E. coli* C43(DE3)接种至含有卡那霉素的 32Y 培养基中, 30 °C、220 r/min 培养, 待菌体密度达到 OD₆₀₀ 为 0.25–0.35 时, 加入终浓度为 0.1 mol/L 的 IPTG, 于 20 °C、220 r/min 诱导表达 24 h, 4 °C、8 000×g 离心收集菌体, 并用 PBS 缓冲液漂洗 2 次。每 2.0 g 湿菌体用 10–15 mL PBS 缓冲液重悬, 并加入终浓度为 20 mmol/L 咪唑、1 mmol/L MgCl₂、蛋白酶抑制剂(每片 10 mL)、100 U/mL DNase, 置于冰上孵育 2 h。然后, 在 4 °C、10⁸ Pa 压力下对菌体进行低温超高压破碎 3 次, 于 4 °C、24 000×g 离心 20 min 去除细胞碎片, 得到的上清液在 4 °C、300 000×g 超高速离心 50 min 得到细胞膜沉淀。将细胞膜沉淀用 PBS 缓冲液重悬, 并加入 20 mmol/L LDAO 表面活性剂, 冰上缓慢摇动(50 r/min)过夜, 4 °C、200 000×g 离心 1 h 去除未溶解的细胞膜, 得到目的蛋白粗提

液。利用 IMAC 和 SEC 对目的蛋白进行纯化, 具体方法同 AgrA 蛋白的纯化方法。

1.2.3 启动子 P2–P3 核心序列的复性

金黄色葡萄球菌的 agr 系统包含 2 个启动子 P2 和 P3, P2 和 P3 之间的序列包含 4 个 AgrA 的结合位点, 据此人工合成了 101 bp 核心序列, 序列见表 1。将合成的正义链与反义链以相同体积混合, 将退火缓冲液(10×)加入到混合物中(终浓度为 1×), 混和均匀, 置于 PCR 仪进行退火反应: 95 °C、2 min; 每 8 s 下降 0.1 °C 退火至 25 °C; 4 °C 30 min。反应结束后, 稀释至 1 μmol/L 备用。

1.2.4 AgrA 蛋白活性的检测

采用 EMSA 法检测 AgrA 蛋白活性, 反应体系为 10 μL。实验设置了 6 组实验, 除了对照组 6 外, 每组实验中加入等量的 DNA, AgrA 蛋白浓度为 0.4–1.0 μg/μL, 具体反应体系见表 2。配制 6% PAGE 凝胶, 将配好的 6% 胶首先在 0.5×TBE 缓冲液中预电泳 30 min。各反应液混匀, 于室温孵育 30 min, 上样至 6% PAGE 凝胶孔中, 65 V 恒压电泳。电泳结束后, 先用 Gel-Red 染色并在凝胶成像仪中观察拍照, 然后通过考马斯亮蓝染色观察凝胶中蛋白条带。

1.2.5 AgrC 激酶活性的测定

利用 Kinase-Glo Luminescent Kinase Assay 试剂盒对 AgrC 激酶活性进行测定。具体方法参考文献[11]。

1.2.6 AgrA/C 双组分信号转导系统生物体外模型的构建

利用表面活性剂介导的方法将 AgrC 蛋白镶嵌至脂质体囊泡双层膜内, 同时将信号分子 AIP 包埋

表 1 启动子 P2 与 P3 之间的 DNA 序列

Table 1 DNA sequences between the P2 and P3 promoter

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')
DNA -F	CCTAACTGTAGGAAATAAATACTTAACTGTAAATGTAATTTGTATTTAATATTTTAAACATAAAA AAATTTACAGTTAAGAATAAAAAACGACTAGTTAAG
DNA -R	CTTAACTAGTCGTTTTTTTATTCTTAACTGTAATTTTTTTATGTTAAAATATTAATACAAATTAC ATTTAACAGTTAAGTATTTATTTCTACAGTTAGG

注: DNA-F: 正义链; DNA-R: 反义链。

Note: DNA-F: Forward primer; DNA-R: Reverse primer.

表 2 AgrA 蛋白 EMSA 检测体系

Table 2 The EMSA reaction system of AgrA

反应 Reactions	核酸 DNA (1 $\mu\text{mol/L}$, μL)	AgrA 蛋白 AgrA (2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, μL)	缓冲液 EMSA buffer (μL)
1	2.0	4.0	4.0
2	2.0	3.0	5.0
3	2.0	2.0	6.0
4	2.0	1.0	7.0
5	2.0	0.0	8.0
6	0.0	0.5	9.5

在囊泡内。AgrC 蛋白的镶嵌方法在文献[12]和[13]基础上进行了优化：将脂质体(DOPC:DPPA:Chol=1:1:0.5, 摩尔质量比)溶解至半溶解状态, 然后以 AgrC:Lipid=1:500 和 AIP:Lipid=1:100 (摩尔质量比)的比例分别加入 AgrC 和 AIP, 室温孵育 45 min, 用 Bio-Beads™ SM-2 Resin 吸附表面活性剂, 3 000 r/min 离心去除 Bio-Beads™ SM-2 Resin 树脂, 将上清液在 10 000 r/min 转速下离心 15 min, 去除未包埋到脂质体囊泡内的 AIP, 蛋白质脂质体再用 HEPES 缓冲液悬浮。

1.2.7 AgrA/C 双组分信号转导模型的 EMSA 评价

实验过程与 AgrA 蛋白活性的 EMSA 测定实验相似。反应体系为 20 μL , 设置了 2 组反应。第一组反应(1-4 号)添加了 AgrC 蛋白脂质体及不同浓度的 AgrA, 具体反应体系为: AgrC proteoliposome with AIP (2 mmol/L) 10 μL , ATP (100 mmol/L) 4 μL ,

AgrA 2 μL , DNA (1 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL , EMSA buffer 2 μL ; 第二组反应(5-8)添加了溶解于表面活性剂的 AgrC 及不同浓度的 AgrA, 具体反应体系为: AgrC (4 mmol/L) 5 μL , AIP (20 mmol/L) 5 μL , ATP (100 mmol/L) 4 μL , AgrA 2 μL , DNA (1 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL , EMSA buffer 2 μL 。各组反应在室温放置 30 min, 并在 6% PAGE、65 V 条件下电泳, 利用 Gel-Red 染色电泳胶并在凝胶成像仪中观察拍照。

2 结果与分析

2.1 AgrA/C 双组分信号转导模型的设计

近年来, 随着耐药性菌株的不断出现, agr 系统作为新的药物靶点备受关注。由于还没有建立在体外快速、高通量筛选抑制剂的药物筛选模型, 以 agr 信号转导通路为靶点的药物开发, 尤其是针对 AgrC 和 AgrA 蛋白为靶点的抑制剂开发受到限制。本文设计了一种 AgrA/C 双组分信号转导模型, 该模型不仅可用于抑制剂的筛选, 具有可实现高通量、易检测、特异性强等优点, 而且将为双组分系统中磷酸传递机制研究提供新的途径。采用的策略及具体操作思路如图 1 所示: (1) 以脂质体模拟细胞。脂质体囊泡内外提供亲水环境, 脂质体二分子膜为信号受体蛋白 AgrC 提供类似天然的环境, 使 AgrC 保持较高生物活性。(2) 利用表面活性剂介导的方法将 AgrC 镶嵌至脂质体上。通过调整膜组成和脂质体溶解状态调控 AgrC 胞内域朝向囊泡

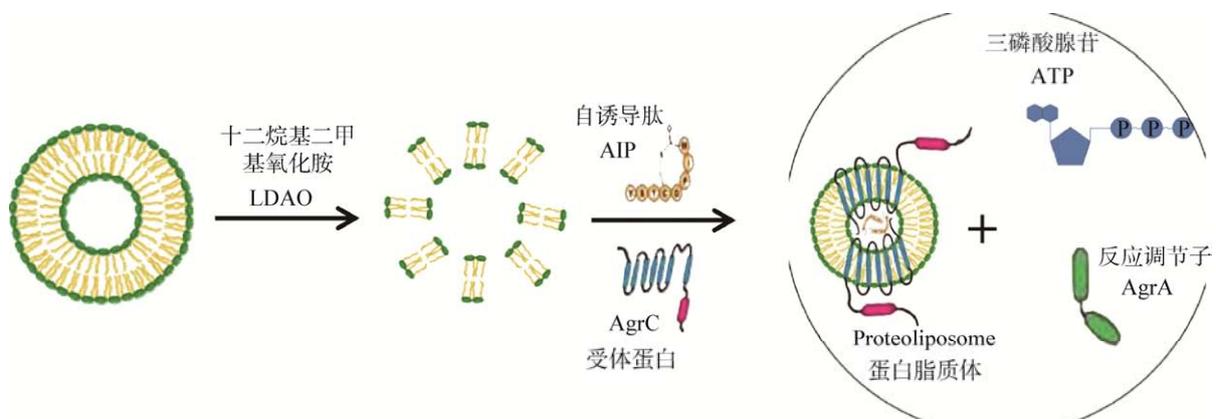


图 1 AgrA/C 双组分信号转导系统的模型

Figure 1 The model of AgrA/C two-component signal transduction system

外,同时将信号分子 AIP 包埋在囊泡内。(3) 在该体系中加入底物 ATP 和 AgrA 即可构成 AgrA/C 双组分信号转导模型。在此模型中, AgrC 接受 AIP 的信号刺激,发生其自身构象变化打开活性部位,在有底物 ATP 存在的情况下发生自我磷酸化转移,将磷酸基团转移至 AgrA 活化 AgrA 蛋白,活化的 AgrA 蛋白可与含有启动子 P2-P3 的 DNA 结合。

2.2 AgrA/C 双组分信号转导模型各元件活性的检测

2.2.1 包含 P2-P3 核心序列的 DNA 复性与检测

包含 P2-P3 核心序列的 DNA 复性后的琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示,复性后的 DNA 条带大小为 101 bp,与理论大小一致,说明复性成功。

2.2.2 受体蛋白 AgrC 和反应调节因子 AgrA 的表达纯化及其活性测定

将重组质粒 pET-28a(+)-AgrA 和 pET-28a(+)-AgrC 分别在大肠杆菌 C43(DE3)菌株中表达,菌体细胞经高压破碎后离心,利用 IMAC 和 SEC 纯化目的蛋白。由于 AgrC 蛋白是膜蛋白,因此在纯化过程中通过超高速离心收集镶嵌有目的蛋白的膜组分,并利用含有表面活性剂的缓冲液进行溶解,纯化后的蛋白电泳检测结果如图 3 所示。AgrA 和

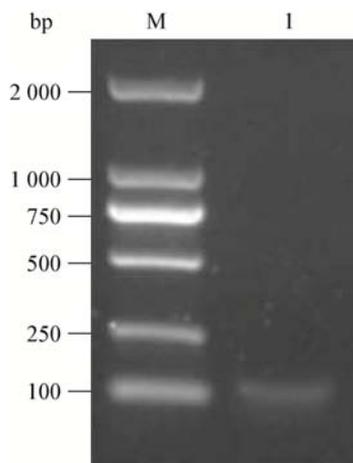


图 2 复性后的 DNA 电泳图

Figure 2 The DNA band after renaturation

注: M: DL2000 DNA 分子量标准; 1: DNA 产物。

Note: M: DL2000 DNA ladder marker; 1: DNA product.

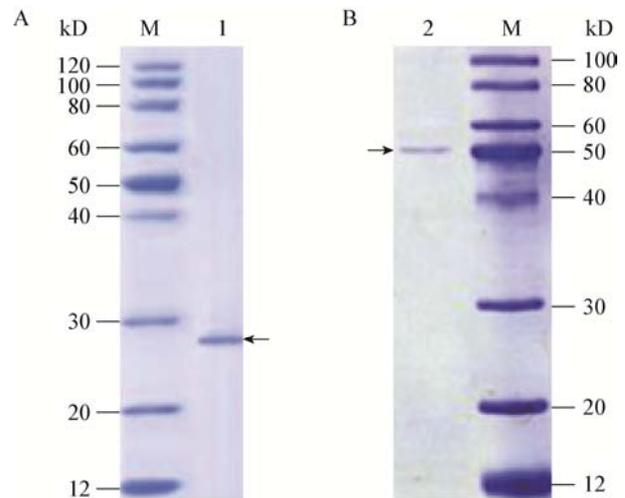


图 3 AgrA (A)和 AgrC (B)蛋白的纯化结果图

Figure 3 SDS-PAGE of AgrA (A) and AgrC (B) purified

注: M: DL2000 DNA 标准分子量; 1: AgrA 蛋白; 2: AgrC 蛋白。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1: AgrA; 2: AgrC.

AgrC 分别在 26 kD 和 48 kD 附近出现条带,分子量大小与理论结果相符,蛋白纯度达到 90% 以上,可用于后续实验。

agr 系统具有 2 个启动子 P2 和 P3, P2 和 P3 之间的碱基序列中包含 4 个 AgrA 的结合位点, AgrA 蛋白以二聚体的形式与 DNA 紧密结合,调控下游蛋白的表达。未被磷酸化的 AgrA 蛋白本身也能与 DNA 结合,即具有本底活性,当被磷酸化后其与 DNA 结合的能力将大幅度提高,从而调控下游基因的表达^[14]。若将 AgrA 与包含 P2-P3 序列的 DNA 混合并反应, AgrA 即可与 DNA 结合,其分子量变大,因此在聚丙烯酰胺凝胶电泳中发生条带迁移现象。

EMSA 结果如图 4A 所示,除了 6 号未加 DNA 外,其余实验组每组反应中均加入了等量的 DNA, 5 号是未添加 AgrA 蛋白的对照组。从图 4A 可知,对照组 5 号泳道中,在 DNA 标准分子量 100 bp 之处可看到明显的 DNA 条带; 1-4 泳道中,随着体系中 AgrA 浓度的增加,分子量大小为 100 bp 之处的 DNA 条带亮度逐渐减少,当 AgrA 浓度

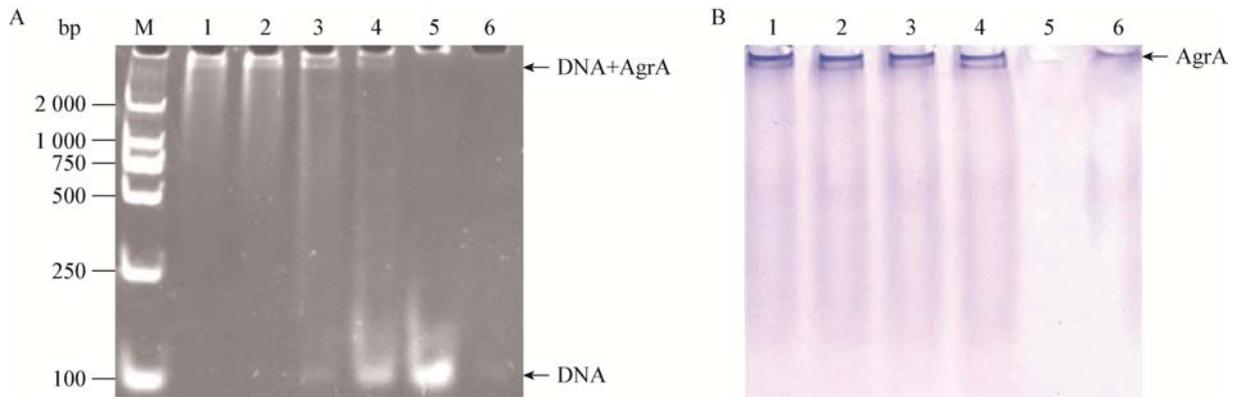


图4 AgrA蛋白的EMSA分析

Figure 4 The electrophoretic mobility shift assay of AgrA

注:A:Gel-Red染色后的凝胶电泳结果;B考马斯亮蓝染色后的凝胶电泳结果图。M:DL2000 DNA标准分子量;1:1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 2:0.75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 3:0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 4:0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 5:0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 6:0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA,未添加P2-P3 DNA。

Note: A: The PAGE gel was observed after Gel-Red staining; B: The PAGE gel was observed after Coomassie Blue staining. M: DL2000 DNA marker; 1: 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 2: 0.75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 3: 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 4: 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 5: 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 6: 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA, without P2-P3 DNA.

大于0.75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时,分子量大小为100 bp之处DNA条带完全消失,DNA条带出现在离上样孔较近的地方,说明DNA结合在AgrA蛋白上。将图4A的凝胶再用考马斯亮蓝染色,并观察AgrA蛋白在凝胶中的位置,结果如图4B所示。图4B中泳道1-6对应于图4A中泳道1-6。当体系中只有AgrA蛋白而未加入DNA时,在离上样孔很近的地方有一条蛋白条带,即为AgrA。随着DNA浓度的增加,AgrA蛋白条带上方的蛋白条带浓度加深,参考图4A中DNA条带位置,可认为这一条带是AgrA-DNA复合物。只有当所纯化出的AgrA蛋白有活性时,AgrA才能结合到DNA并发生延滞现象,因此可以得出如下结论:纯化得到的AgrA蛋白折叠正确,具有活性。

利用Kinase-Glo Luminescent Kinase Assay法测定了纯化得到的AgrC蛋白的激酶活性。测定过程中,分别按0、5、10和15 μg 的浓度梯度将AgrC蛋白加入反应体系中。测定结果如图5所示,随着蛋白量的增多,荧光强度梯度下降,表明体系中剩余的ATP逐渐减少,可证明所纯化的AgrC蛋白具有活性。

2.3 AgrA/C双组分信号转导系统模型的EMSA检测

为验证所设计构建的AgrA/C双组分信号转导

模型,利用EMSA方法进行了评估。结果如图6所示。泳道1-4采用本研究构建的AgrA/C双组分信号转导模型,即体系中添加AgrC跨膜镶嵌的脂质体,而泳道5-8中以表面活性剂溶解的AgrC蛋白代替AgrC跨膜镶嵌的脂质体。由图6可知,在两个体系中,当未添加AgrA蛋白时,在标准分子量100 bp之处出现明显的DNA条带(泳道4和8)。比较泳道1-4与泳道5-8,可观察到实验组1(泳道1-4)中AgrA蛋白与DNA结合能力较强,在小于0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 浓度下即可形成AgrA-DNA

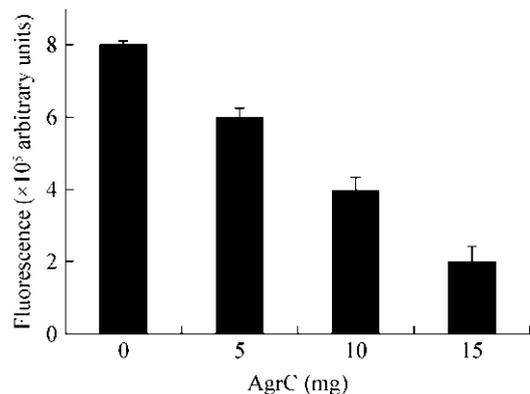


图5 AgrC蛋白激酶活性的测定

Figure 5 Kinase activity of AgrC

注:数据表示为均数 \pm 标准差(n=3)。

Note: The data were expressed as mean \pm standard deviation (n=3).

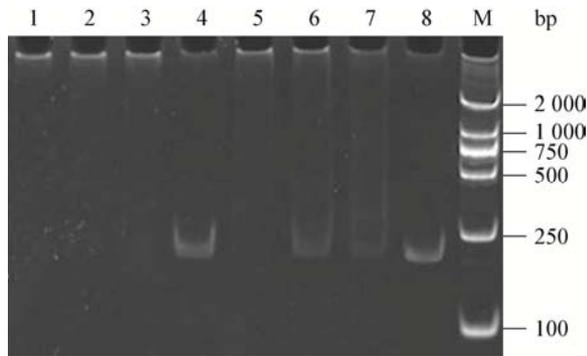


图 6 双组分信号转导模型的 EMSA 分析

Figure 6 EMSA analysis of the two-component signal transduction model

注: M: DL2000 DNA 标准分子量; 1: 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 2: 0.75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 3: 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 4: 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA, 未添加 P2-P3 DNA; 5: 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 6: 0.75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 7: 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 8: 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA, 未添加 P2-P3 DNA. 1-4: 使用 AgrC 蛋白脂质体; 5-8: 使用溶解于表面活性剂的 AgrC. Note: M: DL2000 DNA ladder marker; 1: 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 2: 0.75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 3: 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 4: 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA, without P2-P3 DNA; 5: 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 6: 0.75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 7: 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA; 8: 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA, without P2-P3 DNA. 1-4: EMSA analysis was carried out with AgrC fused into artificial membrane; 5-8: EMSA analysis was carried out with the detergent solubilized AgrC.

复合物并引发条带的迁移,而在实验组 2 (泳道 5-8)中,只有当 AgrA 浓度较高时才能观察到明显的条带迁移。在实验组 1 中, AgrC 蛋白镶嵌在脂质体囊泡的二分子膜中,处于接近于细胞膜的自然状态,不仅具有激酶活性,而且可对 AgrA 蛋白磷酸化,将磷酸基团转移至 AgrA 蛋白,磷酸化后的 AgrA 蛋白与 DNA 的结合能力得到增强,因此在较低浓度下即可观察到明显的条带迁移。在实验组 2 中, AgrC 蛋白溶解于含有表面活性剂的溶液中,尽管其具有激酶活性,但不能对 AgrA 蛋白磷酸化。

图 7 测定了溶解于表面活性剂的 AgrC 蛋白对 AgrA 磷酸化及 DNA 结合能力的影响。1 号和 6 号为对照组,只添加 DNA 或 AgrA, 1-5 号添加了不同浓度 AgrC。从图 7 中可以看出,随着 AgrC 浓度的提高,并没有看到明显的 AgrA-DNA 条带迁移现象,说明 AgrC 对 AgrA 的凝胶迁移率转移影响不显著。

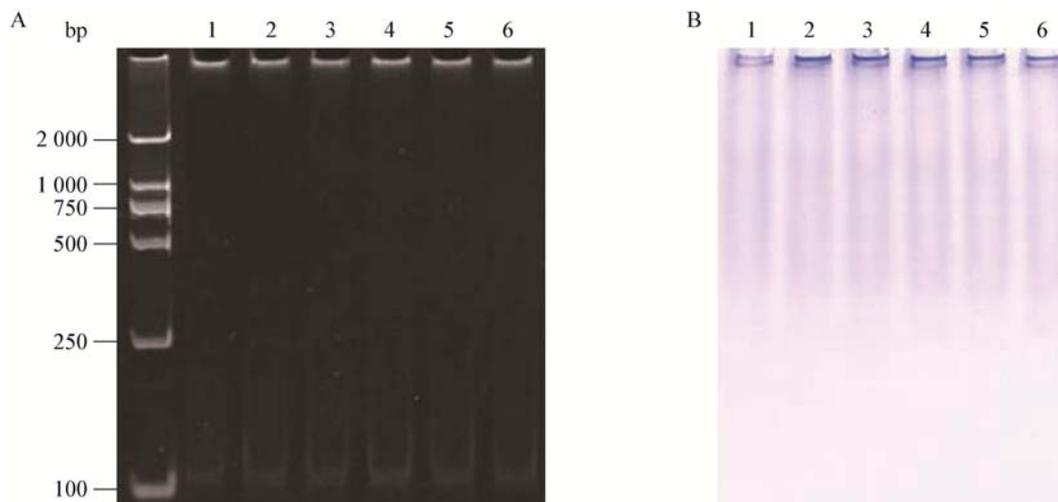


图 7 溶解于表面活性剂的 AgrC 蛋白对 AgrA 迁移率的影响

Figure 7 The influence of the detergent solubilized AgrC on AgrA mobility transfer ability

注: A: Gel-Red 染色后的凝胶电泳结果图; B: 考马斯亮蓝染色后的凝胶电泳结果图. M: DL2000 DNA 标准分子量; 1: 7.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrC; 2: 6.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrC; 3: 4.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrC; 4: 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrC; 5: 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrC; 6: 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrC. 每实验组中含有 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DNA 和 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA.

Note: A: The PAGE gel was observed after Gel-Red staining. B: The PAGE gel was observed after Coomassie Blue staining. M: DL2000 DNA marker; 1: 7.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrC; 2: 6.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrC; 3: 4.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrC; 4: 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrC; 5: 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrC; 6: 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrC. Each reaction includes 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DNA and 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AgrA.

3 讨论与结论

金黄色葡萄球菌作为人类常见的致病菌能引起多种感染,由于其大部分菌株对常用抗生素产生耐药性,控制和由其引发的感染已成为全世界医疗领域急需解决的问题。金黄色葡萄球菌 agr 信号转导系统作为毒力因子的调控系统,在其致病过程中起决定性作用,已成为新的药物靶点。Williams 等在金黄色葡萄球菌耐药性研究过程中,首次提出 agr 系统可作为新的药物治疗靶点,并对其基因组成及表达调控机制进行了详细的研究^[15-16]。美国纽约药科大学的 Novick 研究团队对金黄色葡萄球菌 agr 系统中信号分子 AIP 与受体蛋白 AgrC 分子识别机理方面进行了较为深入的研究,初步提出 AIP 的疏水基团能够结合到 AgrC 的疏水腔使其发生构象变化,进而将信号从胞外转入细胞内^[17-19]。美国威斯康星大学的 Blakwell 团队合成了多种信号分子 AIP 的类似物,期望得到可抑制受体蛋白 AgrC 信号接收和传递的抑制剂,其中 AIP-III Amid 等表现出了良好的活性^[8,10]。

本文利用 AgrC 蛋白脂质体在生物体外模拟双组分信号转导系统,信号分子 AIP 被包埋在蛋白脂质体囊泡内,使 AgrC 处于活化状态,并通过向系统中加入 ATP 和 AgrA 开启信号传递(磷酸基团的转移),使 AgrA 磷酸化并与含有启动子的 DNA 结合,最终通过 AgrA 蛋白的凝胶迁移率转移实验验证该模型的有效性。在构建模型的过程中,我们需要保证每一个组成元件都具有其基础活性,才能保证信号的传递。AgrA 蛋白的活性检测是通过非放射性的 EMSA 来验证。放射性 EMSA 通常借助 P³² 标记的 ATP 结合 DNA 足迹分析技术检测 AgrA 在下游启动子之间序列上的结合位点,并借助 P³² 标记 ATP 的磷酸化分析实验检测 AgrA 的活性^[5]。放射性标记不但对实验条件有严格要求,而且对人体有巨大危害性。本文利用非放射性 EMSA 法来验证 AgrA 蛋白的活性,只有当 AgrA 蛋白正确折叠时,其 LytTR 区域才能与 DNA 结合,在聚丙烯酰胺凝胶中才能发生延滞现象,由于 AgrA 蛋白以

二聚体形式与 DNA 结合,因此可以观察到 AgrA 蛋白的上移和 DNA 条带浓度的减弱。

另一方面,当用溶解在表面活性剂缓冲液中的 AgrC 替换 AgrC 蛋白脂质体进行 EMSA 分析时,发现 AgrC 并不能与 AgrA 蛋白形成复合物,不能有效磷酸化 AgrA 并使之与 DNA 结合。镶嵌于脂质体的 AgrC 由于具有近似天然膜的疏水环境,更利于其活性的维持,这也与文献中报道的脂质体能提高膜蛋白活性的结论一致^[20-21]。

在本研究中,我们初步构建了具有信号传递功能的人工细胞模型,其主要特点是受体蛋白的胞内域朝向细胞外,方便于在体外筛选激酶抑制剂和 AgrA-AgrC 抑制剂等新型抗菌药物,并且为 agr 信号通路中磷酸化/去磷酸化机制研究提供新的途径。

REFERENCES

- [1] Suaya JA, Mera RM, Cassidy A, et al. Incidence and cost of hospitalizations associated with *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in the United States from 2001 through 2009[J]. BMC Infectious Diseases, 2014, 14: 296
- [2] Brown ED, Wright GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era[J]. Nature, 2016, 529(7586): 336-343
- [3] Pragman AA, Schlievert PM. Virulence regulation in *Staphylococcus aureus*: the need for *in vivo* analysis of virulence factor regulation[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2004, 42(2): 147-154
- [4] Novick RP, Projan SJ, Kornblum J, et al. The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*[J]. Molecular and General Genetics, 1995, 248(4): 446-458
- [5] Koenig RL, Ray JL, Maleki SJ, et al. *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNIII-agr regulatory region[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(22): 7549-7555
- [6] Wang JH, Quan CS, Zheng W, et al. Research progress in accessory gene regulatory system of *Staphylococcus aureus*[J]. China Biotechnology, 2008, 28(6): 93-99 (in Chinese)
王军华, 权春善, 郑维, 等. 金黄色葡萄球菌附属基因调节系统[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(6): 93-99
- [7] Gordon CP, Williams P, Chan WC. Attenuating *Staphylococcus aureus* virulence gene regulation: a medicinal chemistry perspective[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2013, 56(4): 1389-1404
- [8] Tal-Gan Y, Ivancic M, Cornilescu G, et al. Characterization of structural elements in native autoinducing peptides and non-native analogues that permit the differential modulation of AgrC-type quorum sensing receptors in *Staphylococcus aureus*[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2016, 14(1): 113-121

- [9] Yang T, Tal-Gan Y, Paharik AE, et al. Structure-function analyses of a *Staphylococcus epidermidis* autoinducing peptide reveals motifs critical for AgrC-type receptor modulation[J]. ACS Chemical Biology, 2016, 11(7): 1982-1991
- [10] Tal-Gan Y, Ivancic M, Cornilescu G, et al. Highly stable, amide-bridged autoinducing peptide analogues that strongly inhibit the AgrC quorum sensing receptor in *Staphylococcus aureus*[J]. Angewandte Chemie, 2016, 55(31): 8913-8917
- [11] Xiong W, Quan CS, Zhang XN, et al. Quantitative analysis of protein orientation in membrane environments by kinase activity[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, 121(2): 242-246
- [12] Wang LN, Quan CS, Liu BQ, et al. Functional reconstitution of *Staphylococcus aureus* truncated AgrC histidine kinase in a model membrane system[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80400
- [13] Xiong W, Quan CS, Wang LN, et al. Effect of different charged liposomes on transmembrane incorporation efficiency of the *Staphylococcus aureus* receptor histidine kinase AgrC[J]. Chemical Journal of Chinese University, 2014, 35(9): 1901-1907 (in Chinese)
熊文, 权春善, 王丽娜, 等. 不同电性脂质体对金黄色葡萄球菌组氨酸激酶 AgrC 跨膜镶嵌效率的影响[J]. 高等学校化学学报, 2014, 35(9): 1901-1907
- [14] Sidote DJ, Barbieri CM, Wu T, et al. Structure of the *Staphylococcus aureus* AgrA LytTR domain bound to DNA reveals a beta fold with an unusual mode of binding[J]. Structure, 2008, 16(5): 727-735
- [15] Williams P. Quorum sensing: an emerging target for antibacterial chemotherapy?[J]. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2002, 6(3): 257-274
- [16] MDowell P, Affas Z, Reynolds C, et al. Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum-sensing system of *Staphylococcus aureus*[J]. Molecular Microbiology, 2001, 41(2): 503-512
- [17] Geisinger EA, George EA, Muir TW, et al. Identification of ligand specificity determinants in AgrC, the *Staphylococcus aureus* quorum-sensing receptor[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(14): 8930-8938
- [18] George Cisar EA, Geisinger E, Muir TW, et al. Symmetric signalling within asymmetric dimers of the *Staphylococcus aureus* receptor histidine kinase AgrC[J]. Molecular Microbiology, 2009, 74(1): 44-57
- [19] Wang BY, Zhao AS, Xie Q, et al. Functional plasticity of the AgrC receptor histidine kinase required for staphylococcal virulence[J]. Cell Chemical Biology, 2017, 24(1): 76-86
- [20] Findlay HE, Booth PJ. The biological significance of lipid-protein interactions[J]. Journal of Physics: Condensed Matter, 2006, 18(28): S1281-S1291
- [21] Lee AG. Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2003, 1612(1): 1-40

~~~~~

## 编辑部公告

### 邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

#### 关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

