

DOI:10.13350/j.cjpb.240409

• 论著 •

# 鼠伤寒沙门菌效应因子 SteA 蛋白的表达纯化与晶体培养\*

范丙乾, 刘晴, 刘瑞瑞, 王玉珍\*\*, 李冰清\*\*

(山东第一医科大学(山东省医学科学院)临床与基础医学院(基础医学研究所)病原生物学系, 山东济南 250000)

**【摘要】** **目的** 对鼠伤寒沙门菌效应蛋白 SteA 进行原核表达与纯化,以期获得高质量蛋白和晶体,为 SteA 的活性检测及结构解析奠定基础。**方法** 利用生物信息学分析方法,对 SteA 的氨基酸及核苷酸序列进行分析,了解蛋白性状与序列保守性;使用基因工程方法,将 *steA* 基因克隆到原核表达载体 pGLO1 上;使用大肠埃希菌 BL21(DE3)进行 SteA 蛋白的外源表达;使用镍离子亲和层析,离子交换层析,凝胶过滤层析的方法对 SteA 蛋白进行体外纯化;使用蛋白结晶试剂盒对提纯的 SteA 蛋白进行晶体普筛,摸索适合的晶体生长条件并进行优化,培养高质量单晶用于结构解析。**结果** 克隆出 SteA 全长及 SteA 35-173 aa 片段基因,并构建了 SteA35-173 aa C58S 突变体。SteA 全长和 SteA 35-173 aa C58S 蛋白在大肠埃希菌感受态细胞 BL21 中成功表达,获得了无聚集的 SteA 蛋白,浓度为 7.6 mg/mL。发现在 1.2 mol/L Sodium phosphate monobasic/0.8 mol/L Potassium phosphate dibasic;0.1 mol/L CAPS/Sodium hydroxide pH 10.5;0.2 mol/L Lithium sulfate 条件下能够获得晶体,条件优化获得可用于数据收集的高质量单晶。**结论** 鼠伤寒沙门菌效应蛋白 SteA 可在原核表达系统中稳定表达,且可溶性良好,Cys58 对 SteA 二聚体的形成起到重要作用。SteA 35-173 C58S 蛋白在磷酸盐和硫酸盐环境中易结晶。

**【关键词】** 鼠伤寒沙门菌;SteA;蛋白纯化;晶体培养

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2024)04-0424-06

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Apr.;19(4):424-429, 435.]

## Purification and crystal culture of SteA protein, an effector of *Salmonella typhimurium*

FAN Bingqian, LIU Qing, LIU Ruirui, WANG Yuzhen, LI Bingqing (Department of Pathogen Biology, School of Clinical and Basic Medicine, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250000, China)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** This study aims to express and purify the effector protein SteA of *Salmonella typhimurium* in prokaryotic expression, in order to obtain high-quality protein and crystals, and lay the foundation for the activity detection and structural analysis of SteA. **Methods** Based on bioinformatics, the amino acid and nucleotide sequences of SteA were analyzed to understand protein traits and sequence conservation. The *steA* gene was cloned into a prokaryotic expression vector by genetic engineering and the SteA protein was stably expressed in *E. coli* BL21. The SteA protein was purified *in vitro* using nickel ion affinity chromatography, ion exchange chromatography, and molecular sieve chromatography in sequence. The purified SteA protein crystals were screened by protein crystallization kit, and the appropriate crystal growth conditions were explored and optimized to cultivate high-quality single crystals for structural analysis. **Results** The full-length and the 35-173 aa fragment of SteA gene were cloned, and a C58S mutant was successfully constructed. The full length and the 35-173 aa C58S protein of SteA were successfully expressed in *E. coli* receptive cell BL21. A non-aggregated form of SteA protein was obtained at a concentration of 7.6 mg/mL. It was found that crystals could be obtained under the condition of 1.2 mol/L Sodium phosphate monobasic/0.8 mol/L Potassium phosphate dibasic;0.1 mol/L CAPS/Sodium hydroxide pH 10.5;0.2 mol/L Lithium sulfate, and high-quality single crystals were optimized for data collection. **Conclusion** The effector protein SteA of *S. typhimurium* can be stably expressed in the prokaryotic expression system and has good solubility. Cys58 plays an important role in the formation of SteA dimers. The SteA 35-173 C58S protein is prone to crystallization in phosphate and sulfate environments.

**【Key words】** *Salmonella typhimurium*; SteA; protein purification; crystal culture

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(No. 32170034)。

\*\* **【通讯作者】** 王玉珍, E-mail: wyzjade1219@163.com; 李冰清, E-mail: bingqingsdu@163.com

**【作者简介】** 范丙乾(1998-),男,山东聊城人,在读研究生,研究方向为病原菌生存适应机制。E-mail: anbq98@163.com

鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*, STM) 属于革兰阴性菌, 是一种食源性致病菌, 主要通过摄入受污染的食物或水传播, 引起急性胃肠炎甚至伤寒, 严重感染导致的死亡多集中在发展中国家, STM 感染引发的健康问题不容忽视<sup>[1]</sup>。STM 主要通过其 III 型分泌系统 (Type III secretion system, T3SS) 来实现入侵并在宿主细胞中生存。STM III 型分泌系统分为 T3SS-1 和 T3SS-2, 分别由致病岛 1 (*Salmonella* pathogenicity islands, SPI-1) 和致病岛 2 (SPI-2) 编码<sup>[2-3]</sup>。在入侵过程中, STM 通过其 T3SS-1 针状复合体 (Needle complex, NC) 贯穿沙门菌的内膜、外膜及宿主细胞膜, 分泌效应蛋白进入宿主细胞<sup>[4]</sup>, 通过效应蛋白与肌动蛋白相互作用, 实现入侵过程<sup>[5-7]</sup>。进入宿主细胞的 STM 会被包裹在一个单层囊泡内, 这个囊泡被称为 SCV (*Salmonella*-containing vacuole)。SCV 内的沙门菌通过 T3SS-2 分泌效应蛋白调控 SCV 的成熟, SCV 可以保护沙门菌免受清除, 为沙门菌的胞内生存提供了良好的复制生态位<sup>[8-9]</sup>, T3SS-2 分泌的效应蛋白是沙门菌胞内生存所必须的<sup>[10-11]</sup>。因此, 通过 T3SS-1 和 T3SS-2 分泌的效应蛋白对于 STM 正常的生命活动十分重要。

STM 通过分泌众多效应蛋白维持其正常生命活动, 其中 SteA (STM 14\_1912) 是鲜有报道的一种效应蛋白, 由 T3SS-1 和 T3SS-2 共同分泌<sup>[2, 12]</sup>。与野生型相比, 感染 SteA 敲除菌的 HeLa 细胞中 SCV 的聚集程度更高, 且形态异常, 表明在 STM 分裂时, SteA 蛋白参与 SCV 膜的正常分裂, 表明 SteA 参与 SCV 膜泡动力学<sup>[13]</sup>, 此外 SteA 被证明在功能上与 SseF 和 SseG 相连, 并表明它可能直接或间接参与细菌液泡上微管马达的调节。Chen 等<sup>[14]</sup>证实 SteA 与 SopD2, SseF, SseG, SifA 5 种效应蛋白一起足以支持宿主细胞中的 STM 复制, 即沙门菌复制最小基因单位。Gulati 等<sup>[12]</sup>通过小鼠感染实验, 发现感染 SteA 敲除菌的小鼠因免疫反应增强, 生存期明显短于野生型沙门菌感染组, 机制上发现 SteA 通过与 Cullin-1 相互作用抑制其 E3 泛素连接酶复合体对 I $\kappa$ B 的泛素化降解, 进而抑制 NF- $\kappa$ B 向细胞核转位发挥转录激活作用。Liu 等<sup>[15]</sup>研究发现 SteA 通过结合 PI(4)P 抑制溶酶体成熟。然而, SteA 结构未知且没有同源结构。因此, 本研究对鼠伤寒沙门菌效应蛋白 SteA 进行原核表达与纯化, 为 SteA 的结构解析和功能探索奠定基础。

## 材料与方法

### 1 材料

**1.1 细胞与载体** 大肠埃希菌感受态 BL21 (DE3), pGLO1 载体由 pET15b 载体改造而来 (氨苄抗性, N

端含有 His 标签), 为本实验室保存。

**1.2 试剂与仪器** 氨苄青霉素及异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自北京索莱宝科技有限公司; DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶 (BamHI, XhoI) 及 T4 连接酶均购自美国 Thermo 公司; 梯度 PCR 仪购自新加坡 ABI 公司; 分光光度计购自上海精密仪器仪表有限公司; Q FF 16/10、superdex 200 Increase10/300GL 凝胶过滤层析柱及 AKTA 蛋白纯化仪均购自美国 Cytiva 公司; 结晶试剂盒购自美国 HAMPTON 公司。

### 2 方法

**2.1 生物信息学分析** 在 Uniprot 数据库中查找 STM 14\_1912 的氨基酸序列及核苷酸序列, 分析效应蛋白 SteA 的氨基酸组成, 使用在线 PSIPRED 网站预测其二级结构, 在 NCBI 数据库中预测其保守结构域, 同源结构、信号肽及跨膜区等, 使用 Pymol 软件分析预测其三级结构。

**2.2 目的基因 PCR 扩增** 根据 SteA 的核苷酸序列和 pGLO1 载体的酶切位点设计引物, 酶切位点选用 BamHI 和 XhoI, 将引物设计为上游引物 SteA-1aa-BamHI-5': 5'-ATAGGATCCATGCCATATACATCAGTTTCT-3' 和下游引物 SteA-FL-XhoI-3T: 5'-ATACTCGAGTTAGTAGCGAGCTTTTATGTC-3', 以鼠伤寒沙门菌 14028 菌株为模板, 对 SteA 进行 PCR 扩增。

扩增体系 (50  $\mu$ L): 1  $\mu$ L 酶 (KOD, plus, Neo)、5  $\mu$ L 10  $\times$  Buffer (KOD, plus, Neo Buffer)、5  $\mu$ L dNTPs、34  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O、3  $\mu$ L MgSO<sub>4</sub>、0.5  $\mu$ L 引物 1 (100  $\mu$ mol/L)、0.5  $\mu$ L 引物 2 (100  $\mu$ mol/L)、1  $\mu$ L 模板。根据引物 GC 含量设置退火温度, 根据碱基数量设置延伸时间, 将 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳回收, 进行载体和目的基因双酶切。将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳回收, 在 22  $^{\circ}$ C 连接体系下连接 3 h, 得到重组质粒。酶切体系 (50  $\mu$ L): 待酶切样品 20  $\mu$ L、10  $\times$  Buffer (FD Buffer) 10  $\mu$ L、14  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O、3  $\mu$ L E1 (FD, BamHI)、3  $\mu$ L E2 (FD, XhoI)。将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳回收, 在 22  $^{\circ}$ C 连接体系下连接 3 h, 得到重组质粒。

**2.3 转化** 在 BL21 感受态中加入重组质粒, 冰浴 30 min, 热激 90 s, 再冰浴 3 min 后加入 500  $\mu$ L 无抗生素 LB 培养基中, 在 200 r/min 37  $^{\circ}$ C 条件下培养 1 h, 把菌液涂布在带有氨苄抗性的平板上 37  $^{\circ}$ C 培养过夜。

**2.4 表达阳性试验** 将转化平板上的单菌落挑至 1 mL 带有氨苄抗性的 LB 培养基中培养 2~3 h, 取 200  $\mu$ L 放至 4  $^{\circ}$ C 冰箱, 在其余菌液中加入 1  $\mu$ L IPTG, 继续培养 1~3 h 后将菌液离心, 用 40  $\mu$ L 2  $\times$  loading buffer 将菌液悬起, 95  $^{\circ}$ C 加热 10 min, 15% SDS-

PAGE 电泳,根据结果保存菌种供后续实验使用。

**2.5 蛋白表达及纯化** 将鉴定阳性的重组菌株转接于带有氨苄抗性的 LB 培养基中过夜培养,次日转接到 1L 含氨苄抗性的 LB 培养基中,于 37 °C,200 r/min 条件下扩大培养,培养至 A<sub>600</sub> 值为 0.5 时降温至 16 °C 继续培养 1 h,加入 200 μL IPTG(终浓度为 0.6 mmol/L)过夜诱导,次日于 4 °C、4 000 r/min(离心半径 13 cm)离心 25 min,收集细菌沉淀。使用 40 mL 重悬 buffer(0.2 mol/L NaCl,0.025 mol/L Tris-HCl pH 8.0)将菌体悬起,加入 200 μL 蛋白酶抑制剂(PMSF),超声破碎 10 min,取样标记为 ce,4 °C,14 000 r/min 条件下离心 50 min,将离心的上清取样记为 s,随后进行镍柱上样,流穿样记为 f,使用重悬 buffer 冲洗镍柱,堵住镍柱灌装 3 mL 重悬 buffer,PP 酶酶切过夜,酶切后样品记为 R。

**2.6 层析纯化** 对阴离子交换柱进行平衡之后,使用 QA buffer(25 mmol/L Tris)将酶切后的蛋白稀释后进行上样,使用 QB buffer(25 mmol/L Tris,1 mol/L NaCl)梯度洗脱,对洗脱的蛋白进行 15% SDS-PAGE 分析,将纯度较高且性质均一的蛋白浓缩至 2 mL,待凝胶过滤层析分子筛平衡后进行上样,洗脱时按照峰收集和体积收集,15% SDS-PAGE 后选择纯度较高的蛋白进行冻存。

**2.7 蛋白片段截取** 根据蛋白预测的二级结构和三级结构,及胰蛋白酶切实实验,获得稳定的蛋白,对全长蛋白进行片段截取。二级预测结构参考 PSIPRED 网站,三级预测结构参考 Uniprot 数据库。

**2.8 蛋白晶体普筛及优化** 将经阴离子交换柱和凝胶过滤层析纯化的蛋白,首先使用 GS PEG600 及 Gird Screen A/S 试剂盒进行初筛,确定蛋白晶体形成的适宜浓度。使用 HAMPTON 的 Matrix、Crystal Screen 等 12 个结晶试剂盒和 CLASSIC 等 4 个结晶试剂盒在坐滴板进行晶体普筛,在悬滴板上进行晶体优化。将晶体培养板置于 18 °C 恒温箱中培养,分别在培养 1 周、2 周、一个月后查看晶体生长情况,进一步培养单晶性良好的晶体。

## 结 果

### 1 SteA FL 的核苷酸序列

ATGCCGTATACCAGCGTTAGCACCTATGCCGTGCACTGAGTGGCAATAAGCTGCCGCATGTTGCAGCCGGCGATTATGAAAATAAGCTGAGCACCAAATTATGAAAGGCATTCTGTATGTGCTGACCGCCGGTCTGGCCTATGGTTTTACCCGCGTGATTGAACATTATTGCAATGTGACCCCGAAAGTTGCCGAATTTTGCGCAAATGCCGGTA

ATATTCATAATCATCTGGCCGATGCCGTGCGTGATGGTCTGTTACCATTGATGTGGAAGCTGAGCGATGGCCGTATGCTGACCTTTGAACAGCTGAGCCTGATTGCAGAAGGTAAACCGATTGTGCGTATTAGCGATGGTGAACATAACCGTTGAAGTGG AAGGTACATTTGAAGAAATTTGTATGCGTCTGGAAGAAGGCTTTTTCGAAGCCCCGGCATATT ATGATTATGATATTGATGAAAAGTACAAGACCGTGCGTGAACGCATGGCAGCCTATAATGCAC TGCCGCAGGCACTGGGTGCCATTCCGTGTCTGGAATATTATATTGCACGTGCAAGCAATATGCAGGAAGCAAAAGCCCAGTGGGCAGCAGATATTAAGGCCCGTTATCATAATTATCTGGATAATTATTAECTCGAG。

SteA FL 的氨基酸序列为:MPYTSVSTYARALSGNKLPHVAAGDYENKLSTKIMKGILYVLTAGLAYGFTRVIEHYCNVTPKVAEFCANAGNIHNLADAVRDGLFTIDVELSDGRMLTFEQLSLIAEGKPIVRISDGEHTVEVEGTFEEICMRLEEGFFEAPAYDYDIDEKDYKTVRERMAAYNALPQALGAIPCLEYYIARASNMQEAKAQWAADIKARYHNYLDNY。

### 2 SteA 生物信息学分析

通过 PrptParam 网站在线预测分析得出效应蛋白 SteA 全长共有 210 个氨基酸(表 1),分子质量为 23.617 ku,等电点为 5.15,有 4 个半胱氨酸、6 个甲硫氨酸,预测结构可溶性较好。该蛋白无信号肽且保守结构域未知,目前在 PDB 数据库中无该蛋白的结构和同源结构。

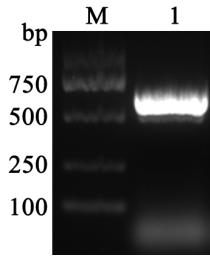
表 1 SteA FL 氨基酸组成  
Table 1 The amino acid composition of SteA FL

氨基酸 Amino acid	数量 Number	频率(%) Frequencies	氨基酸 Amino acid	数量 Number	频率(%) Frequencies
丙氨酸 Ala	26	12.4	亮氨酸 Leu	17	8.1
精氨酸 Arg	10	4.8	赖氨酸 Lys	10	4.8
天冬酰胺 Asn	10	4.8	甲硫氨酸 Met	6	2.9
天冬氨酸 Asp	11	5.2	苯丙氨酸 Phe	7	3.3
半胱氨酸 Cys	4	1.9	脯氨酸 Pro	7	3.3
谷氨酰胺 Gln	4	1.9	丝氨酸 Ser	8	3.8
谷氨酸 Glu	18	8.6	苏氨酸 Thr	11	5.2
甘氨酸 Gly	13	6.2	酪氨酸 Tyr	16	7.6
组氨酸 His	6	2.9	色氨酸 Trp	1	0.5
异亮氨酸 Ile	13	6.2	缬氨酸 Val	12	5.7

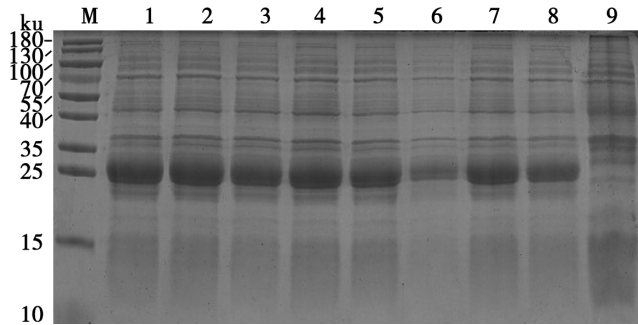
### 3 构建 SteA 基因原核表达体系

SteA 基因序列全长 630 bp,扩增产物大小与预期一致(图 1)。将重组质粒转化至 BL21(DE3)后表达 test,共挑取 8 处单克隆菌落,15% SDS-PAGE 电泳结果如图 2,SteA FL-His 大小约为 25 ku,与过表达带位置一致,将一号菌种进行测序,结果正确,SteA 重组

菌株构建成功。



M DNA 标志物(DL-2000) 1 *steA* FL PCR 产物  
图 1 目的基因 PCR 产物 1%琼脂糖凝胶电泳分析  
M DNA marker(DL-2000) 1 *steA* FL PCR product  
Fig. 1 The agarose gel electrophoresis result of PCR product

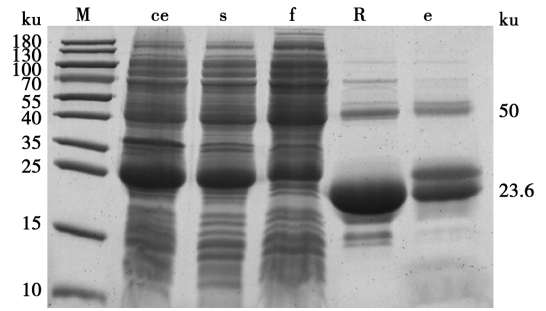


M 蛋白分子质量标准 1~8 *SteA* FL 重组克隆菌株 9 阴性对照  
图 2 阳性克隆表达 *SteA* FL 的 SDS-PAGE 电泳分析  
M Protein marker 1-8 *SteA* FL recombinant clone strain 9 Negative control  
Fig. 2 The result of *SteA* FL expression-test

#### 4 *SteA* 蛋白表达及纯化

对镍离子柱纯化后蛋白取样进行 15% SDS-PAGE 电泳,结果见图 3。将酶切后的蛋白进行层析纯化,根据蛋白洗脱峰位置取样进行 15% SDS-PAGE 电泳分析(图 4~7),成功获得了高纯度的 *SteA* FL 蛋白,蛋白浓度为 8 mg/mL。根据电泳结果可知 *SteA* FL 蛋白性质不稳定易降解且在 50 ku 左右形成二聚体,二聚体的形成是半胱氨酸导致的,因此,根据 *SteA* 的预测三级结构进行片段截取及半胱氨酸的突变,以消除二聚体获得稳定蛋白。

截取后得到 *SteA* 35-173 aa 这一相对稳定的片段,分别将 *SteA* 片段蛋白表面的第 58 位和第 68 位半胱氨酸进行单突变(图 8)。结果表明第 58 位半胱氨酸对 *SteA* 蛋白二硫键的形成起到重要作用,单突变第 58 位氨基酸后,*SteA* 片段蛋白全部以单体的形式存在,因此以同样的方法扩大培养,提纯进行 15% SDS-PAGE 电泳(图 9-13)。获得了高纯度 *SteA* 35-173aa C58S 蛋白,蛋白浓度为 5.1 mg/mL,该片段蛋白性质稳定且以单体形式存在。



M 蛋白分子质量标准 ce 超声破碎后全蛋白 s 超声破碎离心上清 f 上清镍离子柱流穿液 R PPase 酶切洗脱液 e Elution 洗脱液  
图 3 镍离子柱纯化 *SteA* FL SDS-PAGE 电泳分析  
M Protein marker ce Total protein after ultrasound fragmentation s After centrifugal supernatant f Flow R PPase elution e Elution  
Fig. 3 SDS-PAGE result of *SteA* FL protein purification via Ni-NTA

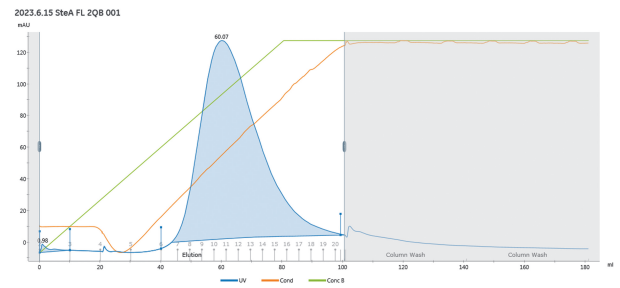
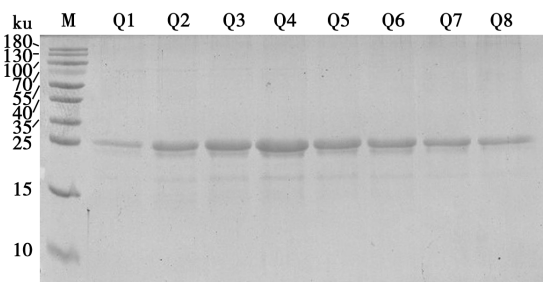


图 4 阴离子交换柱纯化 *SteA* FL 蛋白洗脱峰值图  
Fig. 4 The purification result of *SteA* FL protein by Anion exchange column



M 蛋白分子质量标准 Q1~Q8 Q 柱 8~15 管洗脱液  
图 5 阴离子交换柱纯化 *SteA* FL 蛋白 SDS-PAGE 电泳分析  
M Protein marker Q1-Q8 Elution of Q-columns in tubes 8-15  
Fig. 5 SDS-PAGE result of *SteA* FL protein purification by Anion exchange column

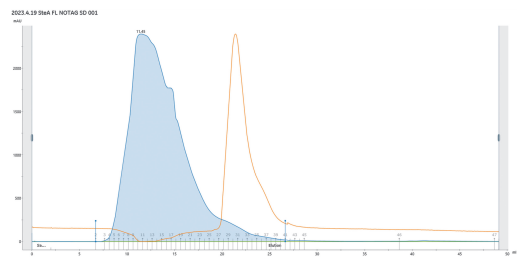
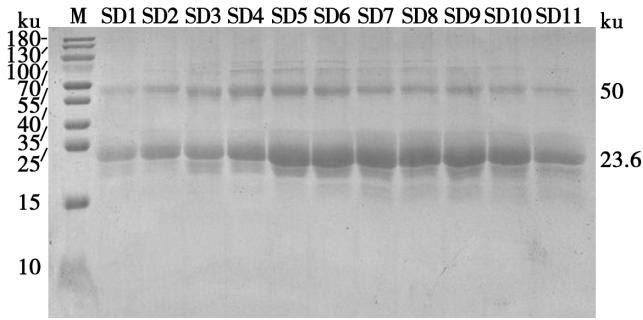


图 6 凝胶过滤层析纯化 *SteA* FL 蛋白洗脱峰值图  
Fig. 6 The purification result of *SteA* FL protein by gel filtration chromatography



M 蛋白分子质量标准 SD1~SD11 第8~18管凝胶过滤层析洗脱液

图7 SteA FL蛋白凝胶过滤层析洗脱 SDS-PAGE 电泳分析

M Protein marker SD1-SD11 Elution of gel filtration chromatography in tubes 8-18

Fig. 7 SDS-PAGE result of SteA FL purification by gel filtration chromatography

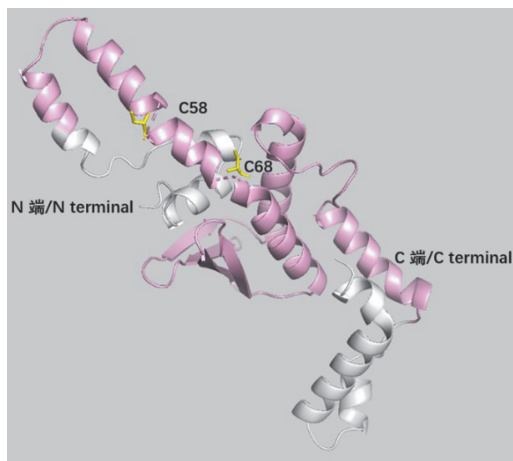
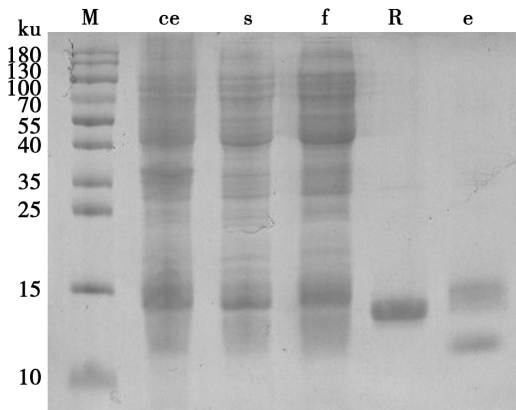


图8 SteA FL三级结构预测模式图

Fig. 8 Prediction of tertiary structure of SteA FL protein



M 蛋白分子质量标准 ce 超声破碎后全蛋白 s 超声破碎离心上清 f 上清镍离子柱流穿液 R PPase 酶切洗脱液 e Elution 洗脱液

图9 镍离子柱纯化 SteA 35-173aa C58S SDS-PAGE 电泳分析

M Protein marker ce Total protein after ultrasound fragmentation s After centrifugal supernatant f Flow R PPase elution e Elution

Fig. 9 SDS-PAGE result of SteA 35-173aa C58S protein purification via Ni-NTA

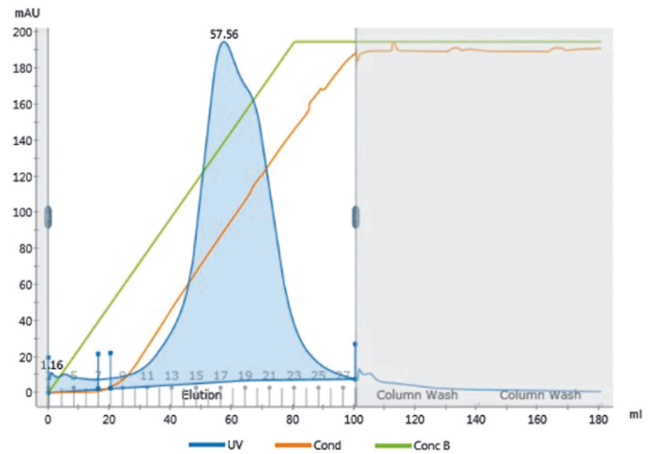
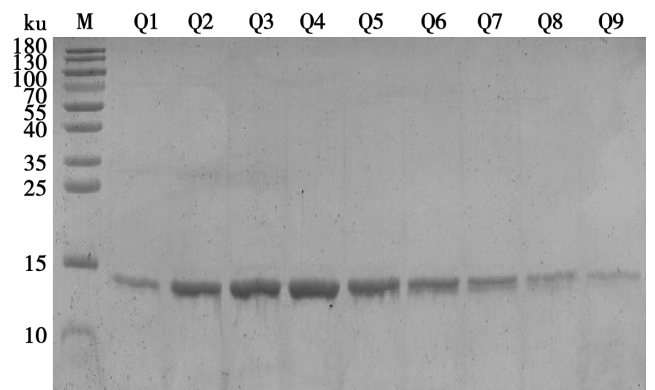


图10 阴离子交换柱纯化 SteA 35-173 C58S 蛋白洗脱峰值图

Fig. 10 The purification result of SteA 35-173aa C58S protein by Anion exchange column



M 蛋白分子质量标准 Q1~Q9 Q柱14~22管洗脱液

图11 阴离子交换柱纯化 SteA 35-173aa C58S 蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

M Protein marker Q1-Q9 Elution of Q-columns in tubes 14-22

Fig. 11 SDS-PAGE result of SteA 35-173aa C58S protein purification by Anion exchange column

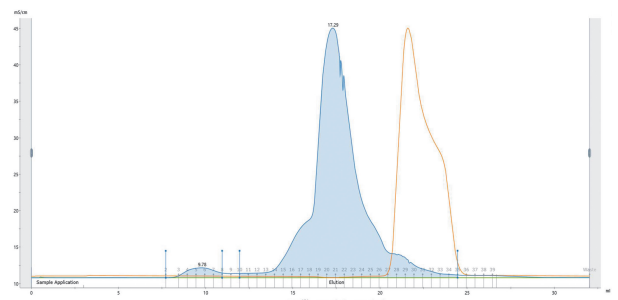


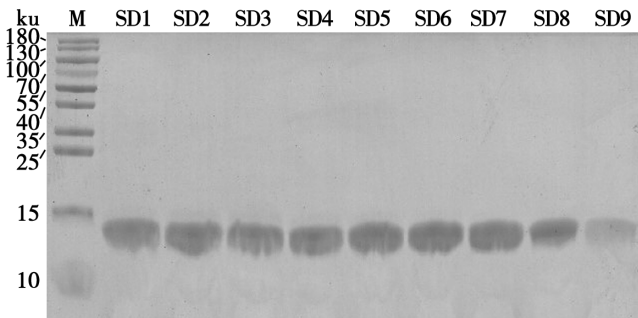
图12 凝胶过滤层析纯化 SteA 35-173aa C58S 蛋白洗脱峰值图

Fig. 12 The purification result of SteA 35-173aa C58S protein by gel filtration chromatography

### 5 SteA 蛋白单晶培养与优化

晶体初筛后,根据蛋白沉淀率确定适宜蛋白浓度为 7.6 mg/mL,蛋白沉淀率约为 35%。使用 HAMPTON 和 CLASSIC 等 16 个结晶试剂盒进行普筛,在 18 °C 培养箱培养 40 d, SteA 35-173aa C58S 在

CLASSIC 1 结晶试剂盒的 1.2 mol/L Sodium phosphate monobasic/0.8 mol/L Potassium phosphate dibasic; 0.1 mol/L CAPS/Sodium hydroxide pH 10.5; 0.2 mol/L Lithium sulfate 条件下形成微小晶体,使用悬滴板进一步优化,SteA 35-173aa C58S 蛋白在 0.9 mol/L Sodium phosphate monobasic/0.6 mol/L Potassium phosphate dibasic; 0.1 mol/L CAPS/Sodium hydroxide pH 10.5; 0.1 mol/L Lithium sulfate 条件下经过 1 个月培养,形成良好单晶(图 14)。



M 蛋白分子质量标准 SD1~SD9 第 18~26 管凝胶过滤层析洗脱液

图 13 SteA 35-173aa C58S 蛋白凝胶过滤层析洗脱 SDS-PAGE 电泳分析

M Protein marker SD1-SD9 Elution of gel filtration chromatography in tubes 18-26

Fig. 13 SDS-PAGE result of SteA 35-173aa C58S purification by gel filtration chromatography

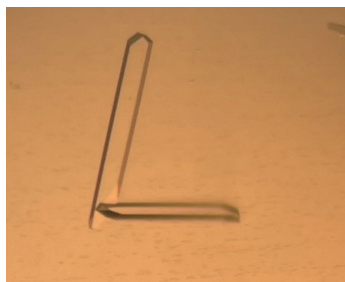


图 14 SteA 35-173aa C58S 蛋白晶体图

Fig. 14 Crystals of SteA 35-173aa C58S

## 讨论

STM 作为一种人兽共患致病菌,在全球范围内有众多感染者,尤其在发展中国家是严重的公共卫生问题,感染人数逐年升高。鼠伤寒沙门菌抵抗外界环境的能力较强,容易随物流及人流传播,宿主感染后会产生胃肠炎症,甚至引发败血症<sup>[16]</sup>。据报道,每年约 100 万人的死亡与该菌的感染有关<sup>[17]</sup>,由 STM 引发的健康问题应受到重视,同时应当加大对于 STM 的研究力度,减轻 STM 的危害。

鼠伤寒沙门菌的致病能力主要依靠其 III 型分泌系统,在入侵宿主细胞和胞内生存过程中,III 型分泌系统

分泌众多效应蛋白参与其中<sup>[18]</sup>。例如 T3SS-1 分泌的效应因子 SopE 可通过促进膜皱缩和细胞骨架重排,介导细菌入侵。T3SS-2 分泌的效应蛋白 SeeL 通过其去泛素活性减弱沙门菌的毒力<sup>[19]</sup>。但效应蛋白 SteA 鲜有报道,其结构未知,功能研究不深入。SteA 作为 T3SS-1 和 T3SS-2 共同分泌的效应因子之一,在入侵和胞内生存过程均有分泌<sup>[2,12]</sup>。有研究表明,通过在 Hela 细胞转染 steA 和空载体,比较细胞的死亡比例,发现转染 steA 组细胞 LDH 释放水平降低,说明 SteA 蛋白与沙门菌的毒力有关,可能有助于上皮细胞感染过程中观察到的细胞死亡延迟。这可能对病原体有益,因为它允许建立一个稳定的细胞内生态位,并有助于避免适应性免疫<sup>[20]</sup>。多项研究表明<sup>[2,12-13,20]</sup>,SteA 在 STM 正常生命活动中起到多重作用,由于 SteA 的蛋白结构未被解析,其分子作用机制并不清晰,极大的限制了 SteA 的效应功能机制研究,因此,SteA 的结构解析对进一步研究其分子机制以及 STM 在宿主内的生存机制具有重要意义。

本研究通过对 SteA 的生物信息学进行分析,了解了该蛋白的基本性质,应用分子克隆技术成功构建了 SteA 重组质粒,使其在 BL21 感受态细胞中高效表达,并提纯了 SteA FL 蛋白,由于 SteA FL 蛋白性质不稳定,不利于晶体生长,因此根据生物信息学分析,成功构建了性质较为稳定且状态均一的 SteA 蛋白片段(SteA 35-173aa C58S)。通过对该片段蛋白进行晶体普筛,成功筛选出了适合晶体生长的条件并加以优化,获得了高质量的单晶。通过解析晶体数据,有助于更好的了解该效应蛋白的结构及作用方式,为 SteA 进一步的结构研究功能研究和靶向鼠伤寒沙门菌效应蛋白 SteA 的药物研发奠定了基础。

## 【参考文献】

- [1] Johnson R, Mylona E, Frankel G. Typhoidal *Salmonella*: distinctive virulence factors and pathogenesis [J]. Cell Microbiol, 2018, 20(9): e12939.
- [2] Cardenal-Munoz E, Ramos-Morales F. Analysis of the expression, secretion and translocation of the *Salmonella enterica* type III secretion system effector SteA[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26930.
- [3] Ibarra JA, Steele-Mortimer O. *Salmonella*-the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival[J]. Cell Microbiol, 2009, 11(11): 1579-1586.
- [4] Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(10): 1102-1109.
- [5] Finlay BB, Brumell JH. *Salmonella* interactions with host cells: in vitro to in vivo[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2000, 355(1397): 623-631.

(下转 435 页)

- [9] Matsushita M, Fujita K, Motooka D, et al. The gut microbiota associated with high-Gleason prostate cancer [J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(8):3125-3135.
- [10] Miyake M, Tatsumi Y, Ohnishi K, et al. Prostate diseases and microbiome in the prostate, gut, and urine [J]. *Prostate Int*, 2022, 10(2):96-107.
- [11] 刘嘉仪, 朱依萍, 韩邦旻, 等. 前列腺癌雄激素剥夺疗法对肠道微生物生态的影响与对策 [J]. *中华医学杂志*, 2023, 103(2):84-88.
- [12] Schmitt FCF, Brenner. Gut microbiome patterns correlate with higher postoperative complication rates after pancreatic surgery [J]. *BMC Microbiol*, 2019, 19(1):42.
- [13] Jacewicz M, Gunzel K, Rud E, et al. Antibiotic prophylaxis versus no antibiotic prophylaxis in transperineal prostate biopsies (NORAPP): a randomised, open-label, non-inferiority trial [J]. *Lancet Infect Dis*, 2022, 22(10):1465-1471.
- [14] Bolyen E, Rideout JR, Dillon, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(8):852-857.
- [15] Adamczyk P, Juszcak K, Prondzinska M, et al. Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in intestinal flora of patients undergoing transrectal ultrasound-guided prostate biopsy-possible shift in biopsy prophylaxis [J]. *Cent European J Urol*, 2017, 70(2):192-196.
- [16] Wiertsema SP, van Bergenhenegouwen J, Garssen J, et al. The interplay between the gut microbiome and the immune system in the context of infectious diseases throughout life and the role of nutrition in optimizing treatment strategies [J]. *Nutrients*, 2021, 13(3):886.
- [17] 中国医学科学院肿瘤医院. 槲皮素肠道菌群代谢物在制备预防和/或治疗前列腺癌药物中的应用: CN202210354361. 0 [P]. 2023-10-24.
- [18] Cestic D, Lugovic ML, Ozretic P, et al. Association of gut lachnospiraceae and chronic spontaneous urticaria [J]. *Life (Basel)*, 2023, 13(6):1280.
- [19] Vacca M, Celano G. The Controversial role of human gut lachnospiraceae [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(4):573.
- [20] Akhtar M, Chen Y. Gut microbiota-derived short chain fatty acids are potential mediators in gut inflammation [J]. *Anim Nutr*, 2022, 8:350-360.
- [21] Zuo WF, Pang Q. Gut microbiota: A magical multifunctional target regulated by medicine food homology species [J]. *J Adv Res*, 2023, 52:151-170.
- [22] Nie Y, Xie XQ. *Desulfovibrio fairfieldensis*-derived outer membrane vesicles damage epithelial barrier and induce inflammation and pyroptosis in macrophages [J]. *Cells*, 2022, 12(1):89.
- [23] Cuevas-Sierra A, Ramos L. Diet, gut microbiota, and obesity: Links with host genetics and epigenetics and potential applications [J]. *Adv Nutr*, 2019, 10(suppl\_1):S17-S30.
- 【收稿日期】 2024-01-15 【修回日期】 2024-03-01
- ~~~~~
- (上接 429 页)
- [6] Mcghee EJ, Hayward RD, Koronakis V. Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin [J]. *EMBO J*, 2001, 20(9):2131-2139.
- [7] Lilic M, Galkin VE, Orlova A, et al. *Salmonella* SipA polymerizes actin by stapling filaments with nonglobular protein arms [J]. *Science*, 2003, 301(5641):1918-1921.
- [8] Ochman H, Soncini FC, Solomon F, et al. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(15):7800-7804.
- [9] Hensel M, Shea JE, Waterman SR, et al. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages [J]. *Mol Microbiol*, 1998, 30(1):163-174.
- [10] Figueira R, Watson KG, Holden DW, et al. Identification of *Salmonella* pathogenicity island-2 type III secretion system effectors involved in intramacrophage replication of *S. enterica* serovar *typhimurium*: implications for rational vaccine design [J]. *mBio*, 2013, 4(2):e00065.
- [11] Figueira R, Holden DW. Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors [J]. *Microbiology*, 2012, 158(5):1147-1161.
- [12] Gulati A, Shukla R, Mukhopadhya A. *Salmonella* effector SteA suppresses proinflammatory responses of the host by interfering with IkappaB degradation [J]. *Front Immunol*, 2019, 10:2822.
- [13] Domingues L, Holden DW, Mota LJ. The *Salmonella* effector SteA contributes to the control of membrane dynamics of *Salmonella*-containing vacuoles [J]. *Infect Immun*, 2014, 82(7):2923-2934.
- [14] Chen D, Burford WB, Pham G, et al. Systematic reconstruction of an effector-gene network reveals determinants of *Salmonella* cellular and tissue tropism [J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29(10):1531-1544, e9.
- [15] Liu K, Kong L, Graham DB, et al. SAC1 regulates autophagosomal phosphatidylinositol-4-phosphate for xenophagy-directed bacterial clearance [J]. *Cell Rep*, 2021, 36(4):109434.
- [16] 赵泽慧, 李强, 何小丽, 等. 鼠伤寒沙门氏菌致病机理的研究进展 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(5):71-75.
- [17] Majowicz ZSE, Musto J, Scallan E, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis [J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 50(6):882-889.
- [18] 徐京华, 焦绪瑶, 侯旭奔, 等. 鼠伤寒沙门氏菌 III 型分泌系统抗感染抑制剂筛选 [J]. *微生物学通报*, 2023, 50(5):2099-2112.
- [19] 王雪, 周航, 胡人阁, 等. 沙门菌毒力岛 I 及 III 型分泌系统研究进展 [J]. *中国兽医杂志*, 2022, 58(1):94-98.
- [20] Cardenal-Munoz E, Gutierrez G, Ramos-Morales F. Global impact of *Salmonella* type III secretion effector SteA on host cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 449(4):419-424.
- 【收稿日期】 2023-11-25 【修回日期】 2024-02-12