

DOI:10.13350/j.cjpb.250301

• 论著 •

鼠伤寒沙门菌 YbiB 蛋白的表达纯化及结构解析

翟莉¹, 李冰清^{2*}, 贾海红^{2*}

(1. 衡水市妇幼保健院, 河北衡水 053000; 2. 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)

【摘要】 **目的** 通过蛋白表达纯化、晶体 X 射线衍射技术解析鼠伤寒沙门菌 YbiB 蛋白的结构, 为进一步探索 YbiB 蛋白参与的生物学过程及功能研究提供结构基础。 **方法** 分子克隆 *ybiB* 基因, 插入 pGL01 表达载体, 构建 *ybiB*-pGL01 重组质粒。诱导并纯化目标蛋白后进行晶体培养。通过上海光源 SSRF 光束线站收集 YbiB 蛋白晶体衍射数据, 解析鼠伤寒沙门菌 YbiB 蛋白的三维结构信息。按照 PDB 官网的要求逐步填充 YbiB 蛋白的相关信息和结构参数。分析鼠伤寒沙门菌 YbiB 蛋白的结构特点并推测其功能。 **结果** 成功构建了融合表达质粒 *ybiB*-pGL01 并转化到 BL21 感受态细胞中; IPTG 诱导表达 YbiB 蛋白, 纯化后蛋白浓度为 0.45 mg/mL; 在 0.1 mol/L Sodium acetate trihydrate pH 4.5, 3.0 mol/L Sodium chloride 条件下, 晶体呈长方体状; 晶体衍射分辨率为 2.34 Å; 解析出鼠伤寒沙门菌 YbiB 的蛋白晶体结构并上传 PDB 数据库, PDB 号为 7Y3P; 鼠伤寒沙门菌 YbiB 呈头对头的二聚体结构, 且单体结构折叠成磷酸核糖基转移酶 III 型家族蛋白的双叶状结构, 与大肠埃希菌 YbiB 在结构上极其相似, 有着相似的表面静电势能分布; 鼠伤寒沙门菌 YbiB 和大肠埃希菌 YbiB 两个蛋白的 PRPP 或磷酸结合位点(天冬酰胺 N89 和酪氨酸 Y88)、DNA 结合位点(精氨酸 R172 和组氨酸 H115)都高度保守。 **结论** 鼠伤寒沙门菌 YbiB 蛋白在原核表达体系中稳定表达, 纯化后的蛋白也可用于晶体培养。YbiB 蛋白结构成功解析并上传至 PDB 数据库。结构分析表明, 鼠伤寒沙门菌 YbiB 与大肠埃希菌 YbiB 可能有着相似的 DNA 结合机制。

【关键词】 鼠伤寒沙门菌; YbiB 蛋白; 蛋白纯化; 晶体培养; 蛋白结构解析

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2025)03-0271-06

[Journal of Pathogen Biology. 2025 Mar.; 20(03): 271-276.]

Expression, purification and structure analysis of YbiB protein of *Salmonella typhimurium*

ZHAI Li¹, LI Bingqing², JIA Haihong² (1. Hengshui Maternal and Child Health Hospital, Hengshui 053000, Hebei Province, China; 2. Department of Pathogenic Biology, School of Clinical and basic Medicine, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences) * **

【Abstract】 **Objective** The structure of YbiB protein of *Salmonella typhimurium* was analyzed by protein expression and purification and crystal X-ray diffraction technique, which provides a structural basis for further exploring the biological process and function of YbiB. **Methods** *ybiB* was cloned and inserted into pGL01 expression vector to construct *ybiB*-pGL01 recombinant plasmid. The target protein was induced and purified for crystal culture. The diffraction data of YbiB protein crystal were collected by Shanghai Light Source SSRF beamline station. Analysis of the three-dimensional structure of *S. typhimurium* YbiB. According to the requirements of the PDB official website, the relevant information and structural parameters of YbiB protein were gradually filled. The structural characteristics of *S. typhimurium* YbiB were analyzed and its function was speculated. **Results** The fusion expression plasmid *ybiB*-pGL01 was successfully constructed and transformed into BL21 competent cells; The expression of YbiB protein was induced by IPTG, and the purified protein concentration was 0.45 mg/mL; The crystal was cuboid under the condition of 0.1 mol/L Sodium acetate trihydrate pH 4.5, 3.0 mol/L Sodium chloride; The crystal diffraction resolution was 2.34 Å; The protein crystal structure of *S. typhimurium* YbiB was analyzed and uploaded to the PDB database, and the PDB number was 7Y3P; *S. typhimurium* YbiB presented a head-to-head dimer structure, and its monomeric structure was folded into the bilobal structure of phosphoribosyltransferase type III family proteins. It was extremely similar to the YbiB of *E. coli* in structure, with a similar distribution of surface electrostatic potential energy; The PRPP or phospho-binding sites (asparagine N89 and tyrosine Y88) and DNA binding sites (arginine R172 and histidine H115) of *S. typhimurium* YbiB and *E. coli* YbiB were highly conserved. **Conclusion** The *S. typhimurium* YbiB was stably expressed in

* **【基金项目】** 衡水市科技计划项目(No. 2022014085Z)。

** **【通信作者】** 李冰清, E-mail: bingqingsdu@163.com; 贾海红, E-mail: jiahh18@126.com

【作者简介】 翟莉(1990-), 女, 河北人, 硕士, 主管检验师。主要研究方向: 病原菌生存及致病机制研究。E-mail: 1363778310@qq.com

prokaryotic expression system, and the purified protein can also be used for crystal culture. The YbiB protein structure was successfully resolved and uploaded to the PDB database. Structural analysis showed that *S. typhimurium* YbiB and *E. coli* YbiB may have similar DNA binding mechanisms.

【Keywords】 *Salmonella typhimurium*; YbiB; protein purification; crystal culture; protein structure analysis

肠道沙门菌是引起人类和动物伤寒和胃肠炎的常见致病菌。伤寒主要由伤寒沙门菌引起,而非伤寒沙门菌,如鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*, STm)通常会引引起胃肠炎^[1]。据估计,非伤寒沙门菌每年导致9300万例肠道感染和155000例相关死亡,使其成为全球公共卫生的主要威胁^[2-3]。STm可定植于肠腔并入侵肠道和其它组织,形成口服抗生素难以清除的持留菌,并作为耐药质粒的储存库促进沙门菌耐药性在肠道内传播^[4-5]。STm利用其Ⅲ型分泌系统(type Ⅲ secretion system, T3SS)分泌的多种效应蛋白来触发炎症反应并维持其在肠道中的复制,可视为病原体协调的宿主反应,这种病原体与宿主之间独特的平衡使其成为一种杰出的胞内病原菌^[6]。了解沙门菌的生存及致病过程对于减少和治疗沙门菌感染有重要意义。

鼠伤寒沙门菌 YbiB 蛋白是一种功能未知但结构保守的蛋白。Schneider 等^[7]指出其同源蛋白大肠埃希菌 YbiB 属于 TrpD2 蛋白家族,可能参与细菌 LexA 控制的 SOS 反应。邻氨基苯甲酸磷酸核糖转移酶(Anthranilate phosphoribosyl transferase, TrpD)除了催化磷酸核糖基团向邻氨基苯甲酸盐转移生成邻氨基苯甲酸磷酸核糖,参与色氨酸生物合成外,还催化烯胺和磷酸核糖基焦磷酸(phosphoribosyl pyrophosphate, PRPP)生成嘌呤/硫胺素中间代谢物磷酸核糖胺(phosphoribosylamine, PRA)^[8-9]。Schneider 等^[7]认为虽然 TrpD2 与邻氨基苯甲酸磷酸核糖转移酶(Anthranilate phosphoribosyl transferase, TrpD)和核苷磷酸化酶Ⅱ类酶(nucleoside phosphorylase class II, NP-II)具有相似的折叠,但不具有一样的催化功能,而是一种新的 DNA 结合蛋白。Obg 是细菌细菌中广泛保守且必不可少的 GTP 酶,在许多重要的细胞过程中起着核心作用,例如核糖体装配/成熟、DNA 复制、细胞分裂、压力应激和细菌持留性^[10]。而大肠埃希菌 YbiB 是 Obg(ObgE)的一种新的高亲和力和相互作用因子,且 ObgE 干扰 YbiB 的 DNA 结合能力^[11]。此外, Courcelle 等^[12]观察到 YbiB 可能在 ObgE 和 SOS 反应之间形成联系, YbiB-ObgE 相互作用的研究为理解 ObgE 的复杂调节细胞作用以及揭示 YbiB 的细胞功能提供了方向。

为进一步了解鼠伤寒沙门菌 YbiB 蛋白的结构和功能,本研究以生物信息学分析为基础,构建鼠伤寒沙

门菌 YbiB 蛋白的原核表达体系,通过 Ni²⁺亲和层析、阴离子交换柱、凝胶过滤层析等方法提取并纯化高纯度的 YbiB 蛋白。再通过晶体培养、晶体 X 射线衍射技术收集 YbiB 晶体衍射数据,并解析 YbiB 蛋白的晶体结构。比对鼠伤寒沙门菌 YbiB 与大肠埃希菌 YbiB 的结构特征,为后续鼠伤寒沙门菌 YbiB 的功能研究奠定结构基础。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株与载体 鼠伤寒沙门菌 14028s 菌株购自美国 ATCC 菌种库;蛋白表达载体 pGL01 为 pET15b 质粒 His-Tag 后加有 PPase 酶切位点改造而来,使用的酶切位点是 BamHI 和 XhoI,具有 Amp⁺抗性,由 IPTG 诱导;感受态大肠埃希菌 BL21(DE3)为本实验室制备及保存。

1.2 实验试剂 限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶购自美国 Thermo 公司;dNTPs、MgSO₄、KOD 酶购自日本 TOYOBO;DNA 纯化回收试剂盒购于天根生化科技公司;质粒提取试剂盒购于山东思科捷;蛋白胨、酵母提取物购自英国 OXOID 公司;琼脂粉、Amp(氨苄青霉素钠)、IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)、Tris-HCL 缓冲液(pH8.0)均购自北京索莱宝;PMSF(蛋白酶抑制剂)、考马斯亮蓝染色液购自碧云天生物技术公司;晶体普筛试剂盒购自美国 Hampton Research 公司。DNAase、PPase 酶为本实验室制备并保存。

1.3 仪器与软件 梯度 PCR 仪购自新加坡 ABI 公司;加热金属浴购自北京金银杏;超声波细胞粉碎机购于宁波新芝;微量核酸蛋白浓度测定仪购自美国 Thermo 公司;AKTA 蛋白纯化仪、Ni²⁺亲和层析柱、阴离子交换柱及凝胶过滤层析柱均购自美国 GE 公司;晶体培养箱购自上海博迅;晶体普筛板、封口膜均购自博亚捷晶公司;晶体 Loop 环购自美国 Hampton Research 公司;晶体 puck(定位盘)、晶体夹钳及冻存支架等配套工具购自上海迅晶生物科技有限公司。晶体衍射数据收集由上海中能第三代同步辐射光源 SSRF 光束线站 BL02U1 完成。晶体衍射数据经 HKL3000 软件、CCP4、XDS 及 Phenix 软件处理,Coot 软件精修优化。

2 方法

2.1 YbiB 蛋白的生物信息学分析 通过 UniProt 数据库查询鼠伤寒沙门菌 14028s 菌株 YbiB 蛋白的氨基酸序列、分子质量、蛋白结构解析情况。使用 ExPasy 网站预测 YbiB 蛋白的基本理化性质。通过 HMMER 网站进行同源蛋白分析。使用在线的 BLAST 比对工具进行序列比对分析并查询同源结构蛋白。利用 SWISS-MODEL 在线工具 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 对鼠伤寒沙门菌 YbiB 进行同源建模。

2.2 *ybiB* 基因的 PCR 扩增 利用 DNAMAN 软件根据 *ybiB* 基因的核苷酸序列及酶切位点设计引物, 上游引物-*ybiB*-*Bam*HI-5': ATAGGATCCATGGA TTATCGCAAGATCATC; 下游引物-*ybiB*-*Xho*I-3': ATACTCGAGTATTCGCTAAAAGCCTGTTCG, 引物由济南铂尚公司完成。以鼠伤寒沙门菌 14028s 菌株为模板, 对 *ybiB* 基因进行 PCR 扩增。获得的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 放入凝胶成像系统观察结果并切胶回收。

2.3 *ybiB*-pGL01 重组质粒构建与验证 将载体 pGL01 以及胶回收后的 PCR 产物进行双酶切, 酶切位点为 *Bam*HI 和 *Xho*I, 37 °C 酶切反应 3 h (载体酶切 3~4 h)。酶切产物切胶回收后的 PCR 产物及载体与 T4 DNA 连接酶 22 °C 连接 3h。将连接产物加入到感受态大肠埃希菌 BL21 细胞溶液中, 冰浴 30 min 后 42 °C 热激 90 s, 置于冰上 2 min, 加入 600 μ L 无抗 LB 培养基 37 °C 恒温恢复培养 1 h。混匀菌体沉淀涂布 Amp⁺ 抗性平板, 过夜培养。取单菌落到 Amp⁺ 抗性 LB 培养基培养 3~4 h 后加入 1 μ L IPTG 诱导 1.5~2 h。菌体沉淀 95 °C 加热 10 min 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测 YbiB 蛋白的表达。阳性菌株由济南铂尚公司测序验证。

2.4 YbiB 蛋白的表达与纯化 将正确重组的 *ybiB*-pGL01/BL21(DE3) 以 5~10 mL 菌液/1 L 的比例接种于 Amp⁺ 抗性 LB 培养基中, 37 °C 200 r/min 振荡至 A₆₀₀ 约 0.6~0.8 时, 16 °C 降温 1 h, 加入 IPTG 低温诱导过夜。离心收集菌体沉淀后, 加入适量 PMSF 及 DNAase 进行超声破碎, 可溶性 YbiB 蛋白即存在于上清液中。然后利用 Ni²⁺ 亲和层析柱进行初步提纯: 镍柱使用之前先平衡镍柱, 即用 Elution buffer (25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、100 mmol/L NaCl、250 mmol/L 咪唑) 满悬冲洗两遍, 然后将上清液缓慢倒入镍柱内, 用重悬 buffer (25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、200 mmol/L NaCl) 满悬两次冲洗镍柱后, 在镍柱内加入 3 mL 的重悬 buffer, 200 μ L 的 PPase 酶切过夜, 留存蛋白洗脱液。取 20 μ L 洗脱液加入 500 μ L 考马斯亮蓝显色液, 进行快速蛋白量鉴定。通过阴离子交换柱、凝胶过滤层析柱进一步纯化 YbiB 蛋白: 阴离子交

换柱先平衡, 然后用 25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 的 Q_A 溶液稀释 5~10 倍后的 YbiB 蛋白溶液进行上样, 利用 25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、1 mol/L NaCl 的 Q_B 溶液进行梯度洗脱, 根据出峰位置对应的蛋白溶液取样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定。收集蛋白浓度高的洗脱液并浓缩至 2 mL, 进行凝胶过滤层析, 先用 SD buffer (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、100 mmol/L NaCl) 平衡凝胶过滤层析柱, 清洗上样管道后将浓缩后的蛋白溶液上样, 同样根据出峰位置取样鉴定。

2.5 YbiB 蛋白的晶体培养 利用晶体普筛试剂盒通过坐滴形式筛选 YbiB 蛋白的晶体生长条件。坐滴板的大孔加入 100 μ L 的晶体生长条件缓冲液, 小的副孔加入 1 μ L YbiB 蛋白溶液 (蛋白浓度约 0.45 mg/mL) 和 1 μ L 条件缓冲液的混合液。用封口膜快速封板后, 放入晶体培养箱培养 (温度 19 °C, 湿度 34%)。培养 1 周、2 周及 1 个月后, 显微镜下观察晶体生长情况, 以得到单晶、形状规则、大小适中的蛋白晶体为宜。

2.6 YbiB 蛋白晶体衍射数据收集 用晶体 Loop 环把加入适量甘油 (冷冻保护剂) 的蛋白晶体及 Loop 一起冻在在晶体 puck (定位盘) 里, 通过液氮罐运输至上海光源进行衍射数据收集。严格按照 X 射线衍射仪的要求, 先预扫描, 找到晶体与曝光仪之间合适的距离、合适的曝光时间, 再调整收集的角度以及每两帧衍射图之间的夹角, 收集晶体衍射图片。

2.7 YbiB 蛋白晶体结构的解析 鼠伤寒沙门菌 YbiB 蛋白有同源结构, 通过分子置换法进行结构解析。解析蛋白晶体结构的步骤已经规范化, 每个步骤都有不同的软件和判断该步骤结果的参数^[13]。如果参数符合标准, 则可以进行下一次操作。有时需要组合多种程序才能完成一步解析操作。结构精修完成后, 准备好 cif 格式的蛋白晶体结构文件, 打开 PDB 网站的主页, 左上角找到 Deposit 子菜单下的 wwPDB OneDep System, 按要求逐步提交结晶信息以及结构参数, 获得 PDB 号。分析鼠伤寒沙门菌 YbiB 的结构特征并推测其功能。

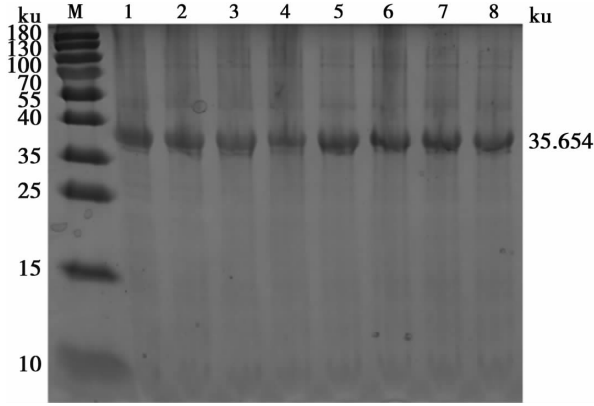
结 果

1 YbiB 生物信息学分析

鼠伤寒沙门菌 YbiB 蛋白的相对分子质量为 35.654 ku; 由 324 个氨基酸组成, 其中半胱氨酸 5 个, 甲硫氨酸 11 个; 等电点 pI 是 6.38; 不稳定指数 44.71, 初步推测可溶性较差。YbiB 蛋白的同源蛋白有 4 438 个, 在细菌中广泛存在。鼠伤寒沙门菌 YbiB 与大肠埃希菌中的 TrpD2 酶-YbiB (PDB 号为 4MUO) 较为相似, 其序列相似度达 85.31%, 可用于同源建模。

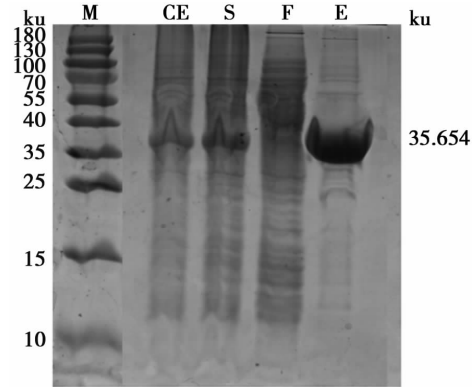
2 *ybiB*-pGL01 重组表达菌株的验证

将连接产物 *ybiB*-pGL01 加入到感受态 BL21 细胞转化,经 IPTG 诱导表达后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,检测 YbiB 蛋白的表达情况,在 35.654 ku 位置有一条过表达带,跟预期相符(图 1)。取 2 号菌种过夜培养后提质粒送测序,结果正确。YbiB 重组菌株构建成功,-80 °C 保存菌种。



M 蛋白分子质量标准 1~8 YbiB 重组菌株克隆
图 1 *ybiB*-pGL01 重组表达菌株的 SDS-PAGE 电泳分析
M Protein Marker 1~8 YbiB recombinant strain clone
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of *ybiB*-pGL01 recombinant expression strain

chloride 条件下观察到晶体生长(图 3),晶体呈长条状。该晶体形状规则、大小适中、单晶,经 X 射线扫描确定该晶体确为蛋白质晶体,晶体分辨率为 2.34 Å 预扫描找到晶体与曝光仪之间合适的距离为 235 mm、合适的曝光时间为 0.5 s,收集的角度设为 180°,每两帧衍射图之间的夹角设为 0.5°,收集到 360 张晶体衍射图片。



M 蛋白分子质量标准 CE 重组菌超声破碎后总蛋白 S 超声破碎离心上清液 F 镍柱流穿液 E 酶切过夜后镍柱蛋白洗脱液
图 2 Ni²⁺ 亲和层析纯化后 YbiB 蛋白的 SDS-PAGE 电泳
M Protein Marker CE Recombinant bacteria total protein S Ultrasonic crushing of centrifugal supernatant F Nickel column flow through liquid E Nickel column protein eluent
Fig. 2 SDS-PAGE result of YbiB protein purified by Nickel column

表 1 YbiB 晶体结构参数

Table 1 YbiB crystal structure parameters

参数 Property	结果 Value
Space group	P 32 1 2
Unit Cell parameters	
a, b, c (Å)	69.77, 69.77, 140.08
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 120.00
Resolution (Å)	34.88-2.34 34.89-2.34
Completeness (%)	97.5(34.88-2.34) 97.5(34.89-2.34)
<I/σ(I)>	2.19(at 2.34 Å)
Rmerge	0.16
R-work	0.242
R-free	0.285
Wilson B-factor (Å ²)	46.8
Anisotropy	0.338

3 YbiB 蛋白的表达与纯化

将 2 号 *ybiB* 阳性表达菌株扩大培养,通过超声破碎法破菌取上清。Ni²⁺ 亲和层析纯化后,得到切除 His 标签的可溶性 YbiB 蛋白(图 2)。阴离子交换柱、凝胶过滤层析柱进一步纯化目的蛋白,混匀蛋白浓度较高的蛋白液,并测得 YbiB 蛋白的浓度为 0.45 mg/mL。在大肠埃希菌 BL21 中异源表达的 YbiB 蛋白在水溶液中稳定存在。

4 YbiB 蛋白的晶体培养与衍射数据收集

普筛 YbiB 蛋白晶体约 2 周,在 0.1 mol/L Sodium acetate trihydrate pH 4.5, 3.0 mol/L Sodium

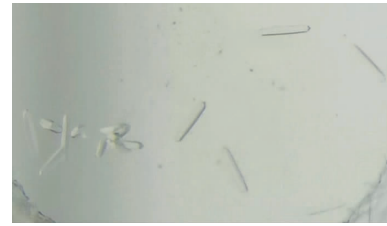


图 3 YbiB 蛋白晶体
Fig. 3 YbiB protein crystals

5 YbiB 蛋白晶体结构的解析

收到的晶体衍射数据首先经 HKL3000 软件处理。通过分子置换法将同源蛋白(PDB 号为 4MUO)的结构放在电子密度图里(.mtz),再把正确的氨基酸画在电子密度图中,该操作主要通过 CCP4、XDS、Phenix 软件处理分析数据。最后利用 Phenix 软件的自动 Refine 功能以及 Coot 软件的手动修正功能对蛋白结构进行优化,使 Rmerge、Completeness (%)、R-work、R-free 等数值符合要求,YbiB 晶体结构参数见表 1,完成 YbiB 蛋白的结构精修。经 PDB 确认蛋白晶体结构无误,生成的 PDB 号码为:7Y3P,并获得 PDB 验证报告。

6 YbiB 蛋白晶体结构特征分析

鼠伤寒沙门菌 YbiB 蛋白呈头对头的二聚体结构(图 4)。单体晶体结构显示,YbiB 折叠成磷酸核糖转

移酶Ⅲ超家族的双叶状结构^[14],包括非连续的N-和C-末端结构域。较小的N-末端 α -螺旋结构域由六个螺旋组成,提供了同源二聚化的接触界面,而较大的C-末端 α/β -结构域由一个中央 β -片段和七个周围 α -螺旋组成。鼠伤寒沙门菌 YbiB 与新解析的大肠埃希菌 YbiB(PDB号 8BFR)在结构上极其相似。基于结构一致性,进一步对两个蛋白进行了功能位点关键氨基酸的可视化分析。鼠伤寒沙门菌 YbiB 与大肠埃希菌 YbiB 有着相似的表面静电势能分布(图 5),底物结合口袋(绿色框部分)均由多个带正电氨基酸残基组成,但同时从红色圈也可以看到鼠伤寒沙门菌 YbiB 的结合口袋的左下部分含有的正电荷明显少于大肠埃希菌 YbiB(红色圈部分),这表明两个蛋白在具有类似功能的同时,也存在底物活性、底物谱等差异的可能性。此外,两个蛋白的 PRPP 或磷酸结合位点(天冬酰胺 N89 和酪氨酸 Y88)、DNA 结合位点(精氨酸 R172 和组氨酸 H115)都高度保守(图 6),这表明两者可能有着相似的 DNA 结合机制。

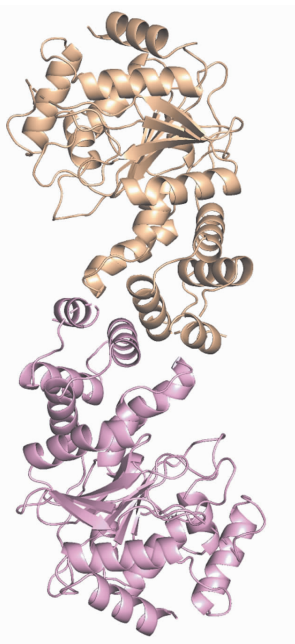
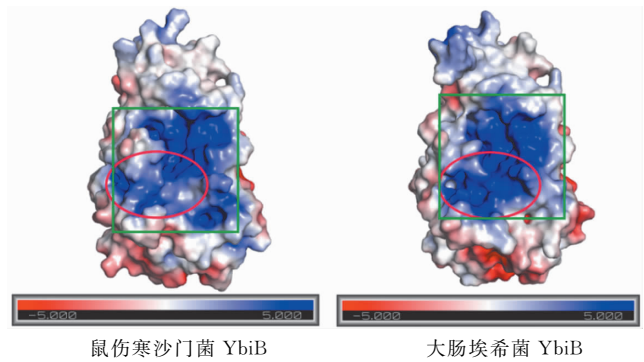


图 4 YbiB 蛋白的晶体结构
Fig. 4 Crystal structure of YbiB protein

讨论

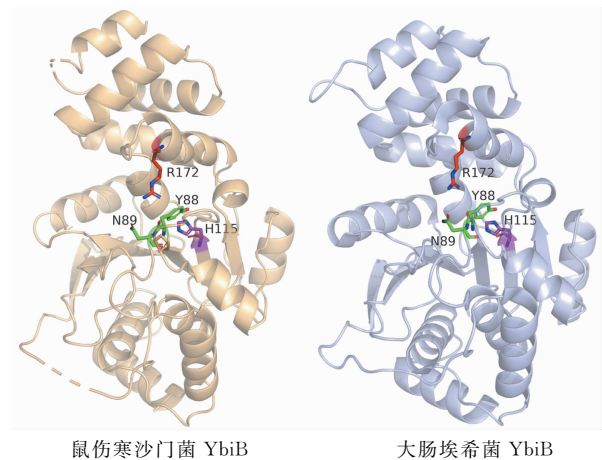
沙门菌感染至今仍然具有全球性的持续威胁^[15]。STm 主要通过受污染的食物和水经口传播,其在肠道的定植是一个复杂的过程,宿主机体免疫系统会试图从肠道中消除沙门菌感染,但反而会促进其在肠道中定植以及促进腹泻等疾病表现^[16]。STm 的入侵以及免疫反应的调控需要附着因子、效应因子等多种蛋白质的参与、配合来完成^[17]。此外,鼠伤寒沙门菌也是遗传上最容易处理和研究最透彻的胞内病原体之一,

一直处于真核宿主细胞代谢研究的最前沿^[18]。STm 生存及致病机制的研究在医学和公共卫生领域具有重要意义。



绿色框为活性口袋,红色圆为活性口袋的差异部分
图 5 鼠伤寒沙门菌 YbiB 与大肠埃希菌 YbiB 的表面电势
Green box for active pocket, red circle is active in the pockets of difference parts

Fig. 5 Surface electric potential of *S. typhimurium* YbiB and *E. coli* YbiB



绿色棍状残基为 PRPP 或磷酸结合的活性位点,红色和粉色棍状氨基酸残基为 DNA 结合位点

图 6 鼠伤寒沙门菌 YbiB 与大肠埃希菌 YbiB 的活性位点分析
The green stick residue is the active site for PRPP or phosphate binding, the red and pink stick amino acid residues are the DNA binding site

Fig. 6 Analysis of active sites of *S. typhimurium* YbiB and *E. coli* YbiB

尽管所有已知的具有核苷磷酸化酶/磷酸核糖基转移酶折叠的蛋白质都是代谢酶,但 YbiB 是一种新型 DNA 结合蛋白,属于核苷酸磷酸化酶/磷酸核糖转移酶折叠的 TrpD2 家族的代表成员^[7]。ybiB 基因与 DNA 解旋酶基因 dinG 形成受 LexA 控制的操纵子,并由 DNA 损伤剂诱导。因此,大肠埃希菌 YbiB 很可能在 SOS 应激反应中起着迄今为止未知的的作用。至于鼠伤寒沙门菌 YbiB 是否具有催化活性,以及它在 DNA 上的功能机制,有待阐明。此外,ObgE 在核糖体生物发生、DNA 复制、细胞分裂等一些列重要细胞过程中发挥的广泛功能作用,而 YbiB 被鉴定为 ObgE 的新的相互作用因子,并且 ObgE 与 DNA 竞争性结

合 YbiB 二聚体表面带高度正电荷的凹槽, 这为了解 ObgE 的复杂调节细胞作用开辟了新视野^[11]。鼠伤寒沙门菌 YbiB-ObgE 相互作用以及 YbiB 本身的确切功能含义和作用尚需深入研究。

蛋白质是细菌生命活动的主要承担者, 为了解鼠伤寒沙门菌 YbiB 蛋白参与的生物学功能, 解析蛋白结构是一种重要的手段。蛋白质的三维结构不仅用于生物技术、生物医学、药物设计和基础研究, 还可作为蛋白质修饰和配体结合的验证工具^[19]。能否成功解析出蛋白晶体结构, 与晶体衍射数据的质量息息相关。在挑选晶体时, 尽可能挑选单晶结构、形状规则、个头尽量大的晶体。高质量晶体 X 射线衍射数据的收集也不仅仅是一个技术性的过程, 更是一个科学的过程^[20]。鼠伤寒沙门菌 YbiB 与大肠埃希菌 YbiB 的单体结构比对结果显示两者有着相似的表面静电势能分布以及高度保守的 PRPP 或磷酸结合位点和 DNA 结合位点, 这表明两者可能有着相似的 DNA 结合机制, 同时又因为两者活性口袋电荷的不完全一致性, 又展示出了两个蛋白的功能差异性, 这些为后续探究鼠伤寒沙门菌 YbiB 蛋白的生物学功能提供了结构依据。

本研究通过分子克隆技术构建了鼠伤寒沙门菌 YbiB 的原核表达体系。IPTG 诱导表达产物经蛋白提取与 Ni²⁺ 亲和层析柱、阴离子交换柱以及凝胶过滤层析的蛋白纯化技术, 获得蛋白浓度和纯度均较高、性状良好的鼠伤寒沙门菌 YbiB 蛋白。该蛋白普筛晶体后, 在 0.1 mol/L Sodium acetate trihydrate pH 4.5, 3.0 mol/L Sodium chloride 条件下, 得到单晶、形状规则、衍射性良好的蛋白晶体。通过上海光源收集到高质量晶体 X 射线衍射数据并成功解析出 YbiB 蛋白晶体结构, 经 PDB 确认蛋白晶体结构后生成的 PDB 号码为: 7Y3P。YbiB 蛋白的成功提纯以及 YbiB 蛋白结构的解析, 为进一步研究其参与的生物学过程以及功能研究奠定了物质和结构基础。结构分析表明, 鼠伤寒沙门菌 YbiB 与大肠埃希菌 YbiB 可能有着相似的 DNA 结合机制, 不过, 在具有类似功能的同时, 也存在底物活性、底物谱等差异的可能性。

【参考文献】

- [1] Menard S, Lacroix-Lamande S, Ehrhardt K, et al. Cross-talk between the intestinal epithelium and *Salmonella typhimurium* [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 906238.
- [2] Balasubramanian R, Im J, Lee JS, et al. The global burden and epidemiology of invasive non-typhoidal *Salmonella* infections [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2019, 15(6): 1421-1426.
- [3] Pulford CV, Perez-Sepulveda BM, Canals R, et al. Stepwise evolution of *Salmonella Typhimurium* ST313 causing bloodstream infection in Africa [J]. *Nat Microbiol*, 2021, 6(3): 327-338.
- [4] Bakkeren E, Huisman JS, Fattinger SA, et al. *Salmonella* persists promote the spread of antibiotic resistance plasmids in the gut [J]. *Nature*, 2019, 573(7773): 276-280.
- [5] Luo Q, Wan F, Yu X, et al. MDR *Salmonella enterica* serovar typhimurium ST34 carrying mcr-1 isolated from cases of bloodstream and intestinal infection in children in China [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75(1): 92-95.
- [6] Galan JE. *Salmonella typhimurium* and inflammation: a pathogen-centric affair [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(11): 716-725.
- [7] Schneider D, Kaiser W, Stutz C, et al. YbiB from *Escherichia coli*, the defining member of the novel TrpD2 family of prokaryotic DNA-binding proteins [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(32): 19527-19539.
- [8] Perveen S, Rashid N, Tang XF, et al. Anthranilate phosphoribosyltransferase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* shows maximum activity with zinc and forms a unique dimeric structure [J]. *FEBS Open Bio*, 2017, 7(8): 1217-1230.
- [9] Lambrecht JA, Downs DM. Anthranilate phosphoribosyl transferase (TrpD) generates phosphoribosylamine for thiamine synthesis from enamines and phosphoribosyl pyrophosphate [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(1): 242-248.
- [10] Chakraborty A, Halder S, Kishore P, et al. The structure-function analysis of Obg-like GTPase proteins along the evolutionary tree from bacteria to humans [J]. *Genes Cells*, 2022, 27(7): 469-481.
- [11] Deckers B, Vercauteren S, De Kock V, et al. YbiB: a novel interactor of the GTPase ObgE [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(7): 3420-3435.
- [12] Courcelle J, Khodursky A, Peter B, et al. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli* [J]. *Genetics*, 2001, 158(1): 41-64.
- [13] 苏纪勇, 姚圆. 蛋白质晶体结构解析原理与技术 [M]. 第 1 版, 北京: 北京大学出版社, 2020: 88-89.
- [14] Mayans O, Ivens A, Nissen LJ, et al. Structural analysis of two enzymes catalysing reverse metabolic reactions implies common ancestry [J]. *EMBO J*, 2002, 21(13): 3245-3254.
- [15] Popa GL, Papa MI. *Salmonella spp.* infection—a continuous threat worldwide [J]. *Germs*, 2021, 11(1): 88-96.
- [16] Chong A, Cooper KG, Kari L, et al. Cytosolic replication in epithelial cells fuels intestinal expansion and chronic fecal shedding of *Salmonella typhimurium* [J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29(7): 1177-1185. e6.
- [17] Azimi T, Zamirnasta M, Sani MA, et al. Molecular mechanisms of *Salmonella* effector proteins: A comprehensive review [J]. *Infect Drug Resist*, 2020, 13: 11-26.
- [18] Thompson A, Fulde M, Tedin K. The metabolic pathways utilized by *Salmonella typhimurium* during infection of host cells [J]. *Environ Microbiol Rep*, 2018, 10(2): 140-154.
- [19] Papageorgiou AC, Poudel N, Mattsson J. Protein structure analysis and validation with X-Ray crystallography [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2178: 377-404.
- [20] Dauter Z. Collection of X-Ray diffraction data from macromolecular crystals [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1607: 165-184.

【收稿日期】 2024-11-02 【修回日期】 2025-01-20