

DOI:10.13350/j.cjpb.220305

• 论著 •

鼠伤寒沙门菌 YfbU 蛋白的表达纯化及晶体衍射^{*}翟莉, 贾海红^{**}, 李冰清^{**}

(山东第一医科大学(山东省医学科学院)基础医学院(基础医学研究所), 山东济南 250062)

【摘要】 目的 为解析鼠伤寒沙门菌 YfbU 的功能,原核表达并纯化 YfbU 蛋白,培养优化蛋白质晶体,通过同步辐射 X 射线散射法收集衍射数据,为该蛋白的结构解析和功能实验奠定基础。**方法** 以 YfbU 蛋白生物信息学预测为基础,使用 PCR 方法扩增沙门菌基因组中的 *yfbu* 基因,再与原核表达载体 PGL01 连接,构建 *yfbu*-PGL01 重组质粒。将重组质粒转化到大肠埃希菌 BL21 感受态中,经阳性筛选且测序正确后,通过 IPTG 诱导目标蛋白的表达。经破碎离心粗提 YfbU 蛋白,然后依次用镍离子亲和柱、阴离子交换柱、凝胶过滤层析柱 3 种方法进行纯化。纯化蛋白先用坐滴板初筛晶体,再用悬滴板优化晶体。获得的单晶、个大、形状规则的晶体送上海同步辐射光源收集衍射数据。**结果** 成功构建了 *yfbu*-PGL01 表达菌株,经 IPTG 诱导表达并纯化获得了高纯度,性状稳定的可溶性 YfbU 蛋白,蛋白浓度达 8.8 mg/ml,蛋白纯度>95%。YfbU 蛋白在 1.0 mol/L Ammonium citrate dibasic,0.1 mol/L Sodium acetate trihydrate, pH4.6 条件下优化出单晶结构、形状规则的晶体。通过上海同步辐射光源的衍射确定为蛋白质晶体,分辨率达到 4.2 Å。

结论 鼠伤寒沙门菌 YfbU 蛋白在大肠埃希菌 BL21 中稳定表达,可溶性好。纯化蛋白经阴离子交换柱和凝胶过滤层析,洗脱液中的蛋白均呈峰型对称的单峰,峰值 UV>2000 mAU,且纯度较高,可用于蛋白质晶体的筛选。YfbU 晶体衍射数据的搜集为进一步解析蛋白结构、筛选 YfbU 蛋白的底物及预测蛋白功能等一系列研究奠定了基础。

【关键词】 鼠伤寒沙门菌;YfbU 蛋白;表达纯化;晶体培养;晶体衍射

【中图分类号】 R378.23

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)03-0272-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Mar;17(3):272-277.]

Expression, purification and Crystal diffraction of YfbU from *Salmonella typhimurium*

ZHAI Li, JIA Hai-hong, LI Bing-qing (Institute of Basic Medicine, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China) ^{***}

【Abstract】 Objective In order to analyze the function of YfbU of *Salmonella typhimurium*, YfbU protein was expressed and purified in *E. coli*, protein crystals were cultured and optimized, and then the diffraction data were collected by synchrotron radiation X-ray scattering, which laid the foundation for follow-up experiments. **Methods** Based on protein bioinformatics, the *yfbu* gene in the genome of *Salmonella* was amplified by PCR, and then ligated with prokaryotic expression vector PGL01 to construct *yfbu*-PGL01 recombinant plasmid. The recombinant plasmid was transformed into the competent state of *E. coli* BL21. After positive screening and sequencing, the expression of target protein was induced by IPTG. YfbU protein was extracted by crushing and centrifugation, and then purified by nickel ion affinity column, anion exchange column and gel filtration chromatography column. The purified protein was first screened by sitting drop plate, and then the crystal was optimized by hanging drop plate. Get a single crystal, a large crystal with regular shape and send it to Shanghai Synchrotron radiation Source to collect diffraction data. **Results** The *yfbu*-PGL01 expression strain was successfully constructed, and soluble YfbU protein with high purity and stable properties was obtained after IPTG induction and purification. The protein concentration was 8.8 mg/ml, and the protein purity was over 95%. YfbU protein was optimized under the conditions of 1.0 mol/L Ammonium citrate dibasic, 0.1 mol/L Sodium acetate trihydrate pH=4.6. It is determined as protein crystal by diffraction of Shanghai synchrotron radiation source, and its resolution reaches 4.2 Å. **Conclusion** YfbU protein of *Salmonella typhimurium* was stably expressed in *E. coli* BL21, and its solubility was good. The purified protein showed a single peak with symmetrical peak shape on anion exchange column and gel filtration chromatography column, with peak UV>2000 mAU and high purity, which can be used for screening protein crystals. The collection of diffraction data of YfbU crystal points out the direction for further analysis of protein structure, screening of substrates of YfbU protein and prediction of protein function.

【Key words】 *Salmonella typhimurium*; YfbU; expression and purification; crystal culture; crystal diffraction

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 31900124, 32170034)。

** **【通讯作者】** 贾海红, E-mail: jia11112222@126.com; 李冰清, E-mail: bingqingsdu@163.com

【作者简介】 翟莉(1990-),女,河北人,硕士在读,检验技师。主要研究方向:微生物致病蛋白的结构和功能研究。E-mail: 1363778310@qq.com

沙门菌属是一类肠道致病菌,分布广泛,血清型多,抗原复杂,可以分为6个亚属,2 200多个血清型。其中,鼠伤寒沙门菌是人畜共患的重要致病菌,其感染发病率居沙门菌感染的首位,占人源沙门菌感染的40%~80%^[1]。鼠伤寒沙门菌主要通过摄入受污染的食物或水传播,引起急性胃肠炎。值得注意的是,该菌感染还可引起全身中毒症状,如在婴儿、老年人和免疫功能低下患者出现败血症,严重者可导致死亡。在医院感染和食物中毒爆发时应引起高度重视^[2]。此外,近年来鼠伤寒沙门菌的耐药性日益突出^[3]。巨噬细胞摄入沙门菌后,会出现耐抗生素的持久性细菌,但对细菌的生理状态知之甚少^[4]。因此,研究鼠伤寒沙门菌的致病过程和生存能力在医学和公共卫生领域都具有重要意义。

沙门菌 YfbU 蛋白属于 YfbU 超家族成员,在生命领域非常保守但其功能尚不明确,可能与细胞生存能力有关^[5]。在毒素等生存压力下,YfbU 蛋白合成增加。yfbu 基因类似于“死亡基因”,删除该基因导致生存能力增强。在该基因缺失的情况下,可发生 SOS 修复反应^[6]。为了在宿主体内存活,沙门菌作为胞内寄生菌,进化出多种细胞内生存机制,以逃避宿主免疫系统的攻击和氧自由基等有害物质的伤害^[7],如减少鞭毛的合成^[8],形成沙门菌囊泡 SCV^[9],应对氧化应激的解毒酶^[10]等。然而,沙门菌的生存机制复杂,很多保守的表达产物是如何发挥作用的尚不明确。了解 YfbU 蛋白在沙门菌中的具体功能及致病过程,有助于阐明沙门菌乃至所有肠杆菌科细菌的生存方式和致病机制。蛋白质三维结构决定其功能,获得高纯度的 YfbU 蛋白对解析蛋白结构很有价值。

本研究以生物信息学为背景,对鼠伤寒沙门菌 YfbU 蛋白的结构及研究现状进行预测,并构建 YfbU 蛋白的原核表达体系,表达的 YfbU 蛋白纯化后培养长出晶体,并通过上海光源拿到晶体衍射数据,为进一步解析其结构及后续的功能研究奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 菌种与表达载体 鼠伤寒沙门菌 ATCC14028 菌株购于美国典型菌种保藏中心(ATCC);PGL01 载体由 pET15b 载体改造而来,amp 抗性,N 端含 His 标签及 PPase 酶切位点,为本实验室保存。大肠埃希菌 BL21 感受态细胞为表达菌株,由山东大学微生物技术国家重点实验室的谷立川教授提供。

1.2 主要仪器 两高速冷冻离心机(4 000 r/min 和 14 000 r/min)分别购于美国 Thermo 公司和德国贺默公司;Vortex Genie-2 旋涡振荡器购于美国 SI 公司;

超声波细胞粉碎机购于宁波新芝生物科技股份有限公司;镍离子亲和柱,阴离子交换柱(Q 柱),凝胶过滤层析柱(分子筛)及 AKTA pure 全自动蛋白质分离纯化系统均购于美国 GE 公司;NanoDrop One C 微量核酸蛋白浓度测定仪购于美国 Thermo 公司;晶体培养箱为 Boxun 有限公司产品;中能第三代同步辐射光源位于上海,简称“上海光源”。

1.3 主要试剂 dNTPs,KOD 酶和 MgSO₄ 购于日本 TOYOBO 公司;限制性核酸内切酶 BamHI 和 XhoI 及 T4 DNA 连接酶均购于美国 Thermo 公司;DNA Marker 购自日本 TaKaRa 公司;DNA 纯化回收试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;高纯度质粒小量快速提取试剂盒购于山东思科捷生物技术有限公司;IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷),氨苄青霉素钠(Amp⁺)和 1 mol/L Tris-HCL 缓冲液(pH8.0)购于北京索莱宝科技有限公司;180 ku 预览蛋白 Marker 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;PMSF(苯甲基磺酰氟),考马斯亮蓝染色液,SDS-PAGE 电泳液及 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(loading buffer)购自碧云天生物技术有限公司。PPase 酶为本实验室保存。16 种蛋白晶体初筛试剂盒,晶体优化试剂盒均购自美国 Hampton Research 公司。

2 方法

2.1 YfbU 蛋白的生物信息学分析 从 Uniprot 数据库选择鼠伤寒沙门菌(ATCC14028)中的 YfbU 蛋白,了解该蛋白的基本信息、研究现状及蛋白序列;使用 Hmmer 软件作序列比对,分析保守氨基酸,进行同源蛋白分析;通过 <http://expasy.org/tools/prot-param.html> 网站预测 YfbU 蛋白的基本性质;登陆 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 网站查找是否有同源结构,与数据库中已有结构进行比对;利用 Swiss model 网站进行同源建模;使用 PyMol 软件分析同源蛋白的结构。

2.2 引物的设计与合成 利用 DNAMAN 软件根据 YfbU 蛋白的基因序列设计引物。上游引物沙门 yfbu-BamHI-5';5'-ATAGGATCCATGGAAATGA CCAACGCGCA;下游引物沙门 yfbu-XhoI-3': ATACTCGAGGGCATTAAATGATTTGATTGA-3'。基因长度 492 bp。引物由济南博尚生物技术有限公司合成。

2.3 目的基因 yfbu 的 PCR 扩增 以沙门菌 14028s 为模板,用合成的引物对 yfbu 基因进行扩增。PCR 体系(50 μL):10×buffer 5 μL,dNTP 5 μL,ddH₂O 34 μL,上游引物 0.5 μL,下游引物 0.5 μL,模板 1 μL,KOD 酶 1 μL,MgSO₄ 3 μL。反应条件:95℃预变性 8 min;95℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸

1 min,共32个循环;72℃后延伸10 min后10℃保温。取50 μL PCR产物加10 μL DNA loading buffer进行1%琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下检测目的片段并进行胶回收。

2.4 *yfbu*-PGL01 重组质粒的构建 将回收的目的片段及PGL01载体分别用BamHI和XhoI进行双酶切。酶切体系:ddH₂O 14 μL,PCR产物/PGL01载体20 μL,10×buffer10 μL,BamHI 3 μL,XhoI 3 μL,37℃反应3 h(载体酶切时间可稍长)。酶切后进行琼脂糖凝胶电泳,切胶回收。然后在T4 DNA连接酶的作用下进行连接反应。连接体系:PCR产物10 μL,PGL01载体2 μL,10×buffer 1.5 μL,T4 DNA连接酶1.5 μL,25℃连接3 h。

2.5 重组质粒的转化及鉴定 取连接产物15 μL加入到制备的BL21感受态细胞中,冰浴30 min,42℃热激90 s后静置于冰上2 min;加入600 μL无抗的LB培养基,37℃200 r/min恒温恢复培养1 h,5 000 r/min离心2 min,弃上清,同时保留100~200 μL LB,菌体沉淀混匀后均匀涂布在抗性平板上,37℃恒温箱培养过夜。

每个平板挑取3~4个单菌落到900 μL相应抗性LB培养基中,37℃培养3~4 h(细菌浑浊即可)。从中吸出200 μL于4℃保存,其余菌液(700 μL左右)加入1 μL IPTG 37℃诱导1.5~2 h,12 000 r/min离心,倒掉上清,加入60~80 μL 1×loading buffer,吹打混匀后95℃加热7~10 min。每个样品取3~4 μL进行SDS-PAGE电泳。若相应大小位置有过表达带说明蛋白表达阳性。阳性菌过夜培养后提质粒,委托济南博尚生物技术有限公司测序并保菌。

2.6 YfbU蛋白的诱导表达 将测序正确的菌种活化后以1:100的比例接种于1 L含Amp⁺的LB培养基中(抗生素比例为1:1 000),37℃、200 r/min培养,当A₆₀₀值为0.6~0.8时,16℃降温1 h,加入100~300 μL/L的IPTG,低温诱导过夜。将诱导过夜的菌液于4℃以4 200 r/min离心20 min,弃上清,加入30 mL左右的重悬buffer(25 mmol/L Tris-HCl pH8.0,200 mmol/L NaCl)后涡旋混匀,然后倒入冰上预冷的干净烧杯内,每升菌加入200~300 μL PMSF(蛋白酶抑制剂)。将烧杯放在冰上超声破碎10 min,破碎后的菌液取样为CE,并倒入50 mL离心管内,4℃、14 000 r/min离心50 min,将上清倒入预冷的烧杯内,并取样为S。

2.7 YfbU蛋白的层析纯化 利用镍离子亲和柱、Q柱、分子筛对目的蛋白进行纯化。镍离子亲和柱先用Elution buffer(25 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 100 mmol/L NaCl,250 mmol/L 咪唑)冲洗两遍,再用重

悬buffer冲洗两遍,平衡后放在层析柜里预冷。将烧杯内的上清液缓慢倒入镍柱内,流到下面的烧杯内,流出液体取样为F。然后用重悬buffer冲洗镍柱两次,洗穿液取样为W。最后将针头换成塞子,向镍柱内加入3 mL重悬buffer,并加入200 μL的PPase,混匀,酶切过夜后将塞子换成针头将蛋白液放出,取样为E。取CE、S、F、W、E进行SDS-PAGE电泳检测。

将镍柱洗脱的YfbU蛋白用AKTA pure全自动蛋白质分离纯化系统先后进行Q柱、分子筛两种方式分离纯化。选取峰位置的蛋白样品进行SDS-PAGE电泳检测。收集浓度和纯度较高的YfbU蛋白,并用微量核酸蛋白浓度测定仪测定蛋白浓度,液氮速冻后置入-80℃冰箱保存备用。

2.8 晶体初筛及优化 纯化的YfbU蛋白先用16种蛋白晶体初筛试剂盒在坐滴条件下初筛晶体。一个坐滴板含有48个大孔,每个大孔的旁边有2个小的副孔。大孔中按顺序加入100 μL不同的条件缓冲液,小的副孔用加入1 μL YfbU蛋白和1 μL条件缓冲液的混合液。加入混合液后迅速用封口膜封板,放入恒温湿晶体培养箱(温度19℃,湿度34%)。大约2周后,小孔中的水分慢慢被下边的池液吸走,蛋白质浓度相对提高而形成YfbU蛋白晶体。

初筛后的YfbU蛋白晶体太小,形状不典型。根据试剂盒说明书确定晶体形成条件对应的试剂成分,在悬滴条件下对该晶体做了进一步优化。影响蛋白质晶体的条件包括蛋白质的纯度和浓度,配体和沉淀剂的浓度、pH,温度和湿度,以及盐离子浓度等。通过对上述条件进行微调,将YfbU蛋白晶体优化成单晶、个大、形状规则的晶体^[11]。具体方法是在悬滴板孔内加入500 μL的池液,然后在硅化盖玻片上点4~5个2 μL池液和2 μL蛋白液的混合液,最后将盖玻片倒置在悬滴板板孔上。孔的周围涂抹凡士林,使盖玻片和池液之间形成一个封闭的体系。放入19℃晶体培养箱培养。

2.9 衍射数据收集 先用loop环把加冷冻保护剂的YfbU晶体捞起来放到液氮罐里冻存,再运输到上海光源进行衍射数据收集。挑取晶体时,把晶体尽量放在loop的中央,并且冷冻保护剂(常用甘油)用量适中,完全包裹住晶体即可。运输过程中,晶体始终置于液氮中。收集数据时,严格按照要求使用X射线衍射仪,先预扫描,找到晶体与曝光仪之间合适的距离及合适的曝光时间,再把收集的角度设为360°,每两帧衍射图之间的夹角设为1°,收集360张衍射图。

结 果

1 YfbU蛋白生物信息学分析

YfbU 蛋白全长 164 个氨基酸,相对分子质量为 19.524 ku。通过多序列比对,与大肠埃希菌中 1WPB、4LR3 有同源结构,相似度为 95.73%。使用 Swiss model 网站进行同源建模,图 1 为 YfbU 的三维建模结构。YfbU 蛋白的等电点为 6.07,全长可溶性好,易于纯化。YfbU 属于 YfbU 超家族成员,同源蛋白有 228 个,在细菌中广泛存在。

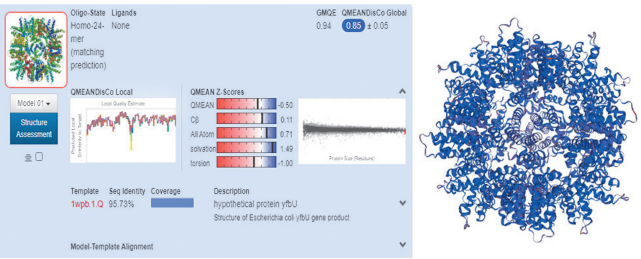
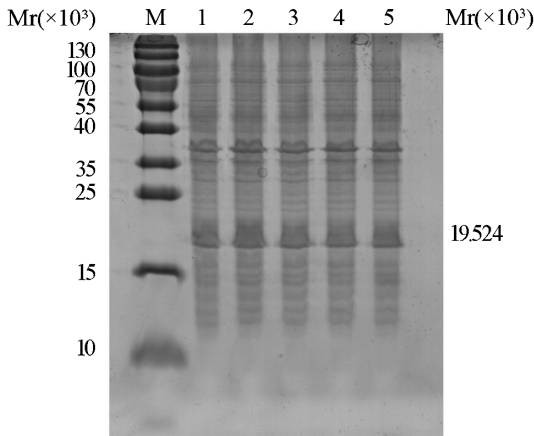


图 1 YfbU 蛋白的同源建模结构模型
Fig.1 Homologous modeling structure model of YfbU protein

2 阳性重组子的鉴定

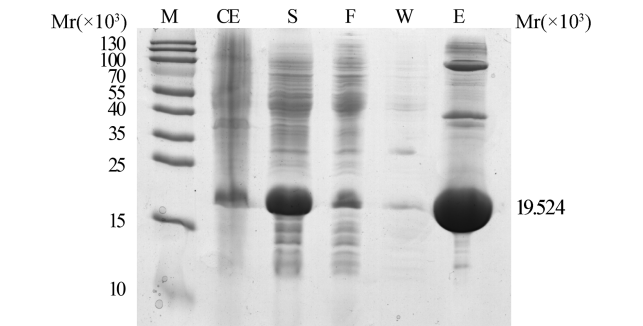
扩增的目的基因 *yfbu* 与 PGL01 载体经双酶切、连接、转化后,筛选单菌落,经 IPTG 诱导表达后进行 SDS-PAGE 电泳分析(图 2)。YfbU 蛋白的相对分子质量约为 19.5 ku,与预期相一致。选取 2 号重组菌过夜培养后提质粒测序,结果正确。



M 蛋白分子质量标准 1~5 种不同的重组菌株
图 2 阳性重组子表达产物的 SDS-PAGE 电泳鉴定
M Protein Marker 1-5 Five recombinants
Fig.2 Identification of positive recombinant protein by SDS-PAGE

3 YfbU 蛋白的层析纯化

将 2 号测序正确的菌液活化后扩大培养,低温 IPTG 诱导过夜,然后离心留菌,超声破碎,再高速离心留上清,经过镍离子亲和柱纯化,将取样的 CE、S、F、W、E 进行 SDS-PAGE 电泳检测,获得纯度较高的 YfbU 蛋白(图 3)。



M 蛋白分子质量标准 CE 重组菌诱导表达后超声破碎后总蛋白 S 重组菌诱导表达后超声破碎上清 F 镍柱上样后流穿液 W 重悬 buffer 冲洗后流穿液 E 酶切过夜后镍柱最终洗脱液
图 3 镍离子亲和柱纯化后的 YfbU 蛋白 SDS-PAGE 电泳
M Protein Marker CE Crude extraction S Protein of crushed supernatant F Flow through E Elution
Fig.3 SDS-PAGE result of YfbU protein purified by Nickel column

镍柱洗脱的 YfbU 蛋白进一步用 AKTA pure 全自动蛋白质分离纯化系统进行 Q 柱纯化,根据蛋白洗脱峰的位置(图 4),取 8~15 管的 YfbU 纯化蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测(图 5)。Q 柱纯化后,将蛋白浓缩至 2 mL 左右,再进行分子筛纯化,同样是收集洗脱峰下的蛋白(图 6,3-11 管)进行 SDS-PAGE 电泳检测(图 7)。经过 3 种方法纯化后,经 NanoDrop One C 微量核酸蛋白浓度测定仪测定收集的 YfbU 蛋白浓度为 8.8 mg/ml,蛋白纯度>95%。收集的 YfbU 蛋白在液氮速冻后置于-80℃冰箱保存。

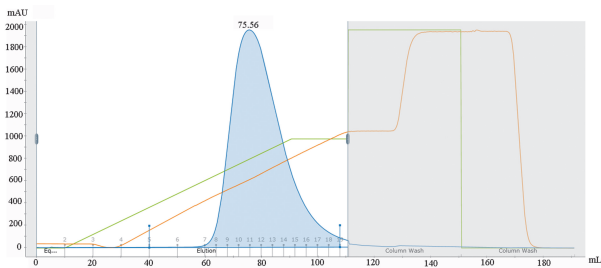
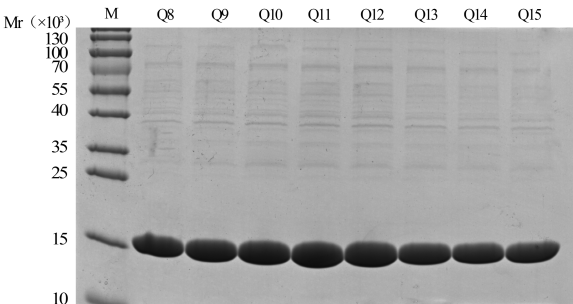


图 4 YfbU 蛋白的 Q 柱层析纯化
Fig.4 The purification result of YfbU protein by Q column



M 蛋白分子质量标准 Q8-15 8~15 管蛋白洗脱液
图 5 Q 柱层析纯化的 YfbU 蛋白 SDS-PAGE 电泳分析
M Protein Marker Q8-15 8-15 tube protein eluent
Fig.5 SDS-PAGE result of YfbU protein purified by Q column

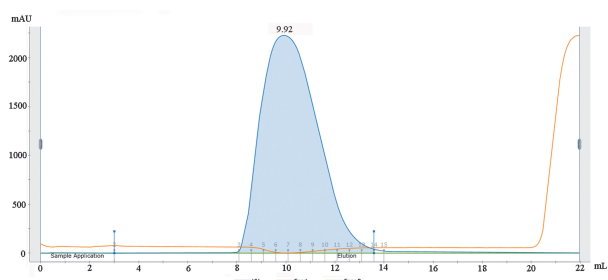
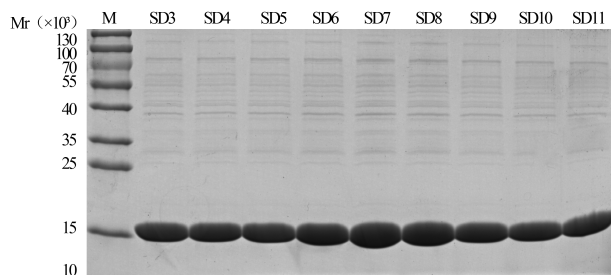


图6 YfbU蛋白的分子筛纯化

Fig. 6 Molecular sieve purification of YfbU protein



M 蛋白分子质量标准 SD3-11 3-11 管蛋白洗脱液

图7 分子筛纯化的YfbU蛋白SDS-PAGE电泳检测

M Protein Marker SD3-11 3-11 tube protein eluent

Fig. 7 SDS-PAGE result of YfbU protein purified by Molecular sieve

4 晶体培养

用 Hampton Research 16 种蛋白晶体初筛试剂盒培养晶体, 大约 2 周后观察到 PEGRX™ 2 HR2-084 的 D₆ 孔、Crystal Screen™ HR2-110 的 F₅ 孔、SaltRx™ 1 HR2-107 的 C₃、C₄、H₆ 孔长出了晶体。但此时的 YfbU 蛋白晶体太小、形状不典型。在悬滴条件下对晶体形成的条件做了多轮优化, 最终在 1.0 mol/L Ammonium citrate dibasic, 0.1 mol/L Sodium acetate trihydrate, pH 4.6 条件下优化出较好的蛋白晶体(图 8)。

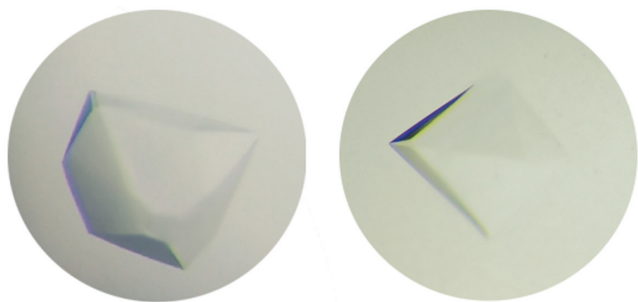


图8 YfbU蛋白晶体

Fig. 8 YfbU protein crystals

5 衍射数据收集

通过上海光源的 X 射线衍射仪收集数据, 先预扫描, 找到晶体与曝光仪之间合适的距离为 372.0 mm, 合适的曝光时间为 0.50 s。然后开始收集 360 张衍射

图。经数据分析, 分辨率为 4.2 Å (图 9)。

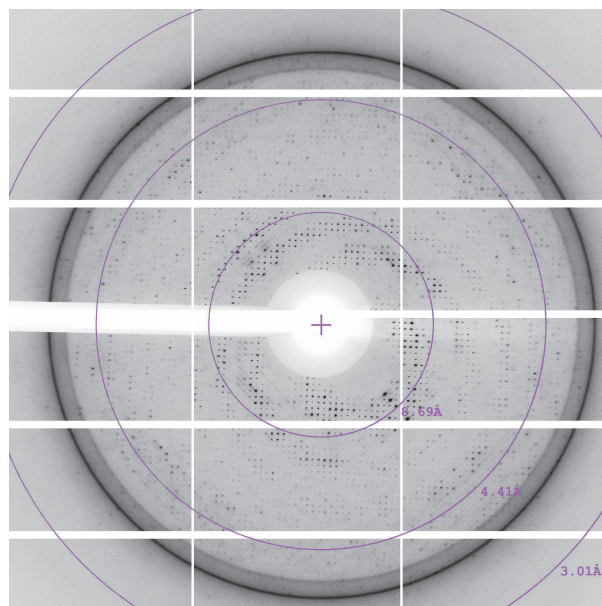


图9 YfbU蛋白晶体衍射图

Fig. 9 YFBU protein crystal diffraction

讨论

鼠伤寒沙门菌宿主谱广, 致病性强, 是危害公共卫生安全的重要食源性病原体^[12], 可引起胃肠炎、败血症, 常伴有头痛、呕吐、腹痛和腹泻等临床症状^[13]。该菌对宿主的感染是一个多因素协同作用过程^[14-16]。由于致病过程往往由众多基因协调配合, 再加上调控机制复杂, 尚未准确掌握沙门菌致病机制^[17]。但可以明确的是, 鼠伤寒沙门菌进入宿主细胞后能够在巨噬细胞内生存繁殖, 同时会不可避免的受到宿主体内诸如营养匮乏、酸、活性氧等不利环境的影响^[18]。近年来对沙门菌的研究主要集中在免疫逃逸方面, 在宿主体内的生存机制方面的研究鲜有报道^[19]。*yfbu* 是一种“死亡基因”, 可能在翻译抑制和 DNA 损伤两种情况下都参与细胞死亡, 亦或者仅在 DNA 损伤或翻译被抑制时才参与细胞死亡^[5]。SOS 反应是由 *recA-lexA* 基因介导的应对 DNA 损伤广泛时的一种重要的 DNA 修复方式, 而 SOS 反应可以发生在删除 *yfbu* 基因的细胞中^[6]。有研究发现, 在细菌 DNA 损伤后有 1000 多个基因改变了表达水平, 其中一个主要变化就是参与蛋白质生物合成的基因被抑制^[20]。通过生物信息学分析, YfbU 的同源蛋白有 228 个, 在细菌中广泛存在。因此, 阐明 *yfbu* 等基因的生物学功能, 探究 YfbU 蛋白表达的时间、空间和条件对于了解鼠伤寒沙门菌乃至其他生物体中 DNA 损伤反应的性质以及在宿主体内的生存机制具有重要意义。

蛋白质的三维结构可用于生物技术、生物医学、药

物设计和基础研究,也可作为蛋白质修饰和配体结合的验证工具^[21]。因此,了解 YfbU 蛋白的生物学功能和生理特性,获得其三维结构具有重要的意义。晶体 X 射线衍射技术是测定蛋白质三维结构的主要技术,而晶体的质量对衍射分辨率乃至结构的解析至关重要^[22]。经过对结晶形成条件的优化,确定了个大、单晶结构、形状规则的晶体形成条件,并收到了一组衍射数据,分辨率尚可。虽暂时没能解出其晶体结构,但通过上海光源的衍射,确定了该晶体为蛋白质晶体,而非盐晶。因此在挑取晶体前,可以尝试通过在含有浓度增加的甘油(5%~25%,以 5%的增量)的溶液中逐步平衡晶体的方式对晶体进行脱水,可能有助于进一步提高晶体的衍射分辨率^[23]。另外,通过改换其他优化的晶体形成条件,改变冷冻保护剂,添加 Additive,快速干燥蛋白质晶体^[24]等,有望得到更高质量的衍射图并解析出 YfbU 蛋白的结构。

本研究应用分子克隆技术成功构建了 *yfbu*-PGL01 重组质粒。通过 IPTG 诱导 YfbU 蛋白在大肠埃希菌中大量、高效表达。纯化的蛋白经镍离子亲和柱纯化后,在 Q 柱和分子筛上均表现为峰型对称的单峰,峰值 UV>2 000 mAU。SDS-PAGE 电泳检测表明,该蛋白可溶性好,浓度及纯度均较高。更重要的是,高纯度 YfbU 蛋白的获得为分析蛋白生化功能、蛋白质修饰、筛选作用底物等研究奠定了物质基础。通过不断摸索蛋白结晶的条件,经过多轮优化,得到了优质的晶体,并经 X 衍射确定为蛋白晶体,为进一步收集衍射数据并解析蛋白结构积累了经验。目前,对于 YfbU 蛋白响应环境信号、在细胞内的生存能力、应对不同压力刺激下的具体分子机制研究尚处于探索阶段,亟待深入探讨。

【参考文献】

- [1] 周庭银,章强强. 临床微生物学诊断与图解 [M]. 4 版. 上海:上海科学技术出版社,2017:315-322.
- [2] Fàbrega A, Vila J. *Salmonella enterica* serovar typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation [J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(2): 308-341.
- [3] Proroga YTR, Mancusi A, Peruzy MF, et al. Characterization of *Salmonella typhimurium* and its monophasic variant 1,4,[5],12:i:- isolated from different sources [J]. Folia Microbiol (Praha), 2019, 64(6): 711-718.
- [4] Stapels DAC, Hill PWS, Westermann AJ, et al. *Salmonella persisters* undermine host immune defenses during antibiotic treatment [J]. Science, 2018, 362(6419): 1156-1160.
- [5] Amitai S, Kolodkin-Gal I, Hananya-Meltabashi M, et al. *Escherichia coli* MazF leads to the simultaneous selective synthesis of both "death proteins" and "survival proteins" [J]. PLoS Genet, 2009, 5(3): e1000390.
- [6] Erental A, Kalderon Z, Saada A, et al. Correction for erental et

- al. "Apoptosis-like death, an extreme SOS response in *Escherichia coli*" [J]. mBio, 2020, 11(6): e03040-20.
- [7] 宋楠楠,杜忠君,岳盈盈,等. 鼠伤寒沙门菌 ydiU 基因敲除株的构建及其在压力培养条件下的生长特性研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(12): 1415-1419, 1428.
- [8] Li B, Yue Y, Yuan Z, et al. *Salmonella* STM1697 coordinates flagella biogenesis and virulence by restricting flagellar master protein FlhD4C2 from recruiting RNA polymerase [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(17): 9976-9989.
- [9] LaRock DL, Chaudhary A, Miller SI. *Salmonellae* interactions with host processes [J]. Nat Rev Microbiol, 2015, 13(4): 191-205.
- [10] Aussel L, Zhao W, Hebrard M, et al. *Salmonella* detoxifying enzymes are sufficient to cope with the host oxidative burst [J]. Mol Microbiol, 2011, 80(3): 628-640.
- [11] 苏纪勇,姚圆. 蛋白质晶体结构解析原理与技术 [M]. 北京:北京大学出版社, 2020: 25-26.
- [12] Malaeb M, Bizri AR, Ghosn N, et al. *Salmonella* burden in Lebanon [J]. Epidemiol Infect, 2016, 144(8): 1761-1769.
- [13] Yin Y, Zhou D. Organoid and enteroid modeling of *Salmonella* infection [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8: 102.
- [14] Young AM, Palmer AE. Methods to illuminate the role of *Salmonella* effector proteins during infection: A review [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017(7): 363.
- [15] Horstmann JA, Lunelli M, Cazzola H, et al. Methylation of *Salmonella Typhimurium* flagella promotes bacterial adhesion and host cell invasion [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2013.
- [16] Kirby AC, Yrlid U, Wick MJ. The innate immune response differs in primary and secondary *Salmonella* infection [J]. J Immunol, 2002, 169(8): 4450-4459.
- [17] 侯悦,刘洁. 肠炎沙门氏菌中侵袭相关毒力基因研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(10): 3867-3873.
- [18] Yang Y, Yue Y, Song N, et al. The YdiU domain modulates bacterial stress signaling through Mn²⁺-dependent UMPylation [J]. Cell Rep, 2020, 32(12): 108161.
- [19] 马玥,杨银龙,岳盈盈,等. 鼠伤寒沙门菌修饰酶 YdiU 的表达、纯化及晶体培养 [J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(11): 1241-1244, 1249.
- [20] Khil PP, Camerini-Otero RD. Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli* [J]. Mol Microbiol, 2002, 44(1): 89-105.
- [21] Papageorgiou AC, Poudel N, Mattsson J. Protein structure analysis and validation with X-ray crystallography [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2178: 377-404.
- [22] 郭玲,章金勇,刘东,等. 幽门螺杆菌黏附素 HpaA 重组蛋白的表达、纯化及晶体生长 [J]. 免疫学杂志, 2015, 31(11): 986-990.
- [23] Heras B, Edeling MA, Byriel KA, et al. Dehydration converts DsbG crystal diffraction from low to high resolution [J]. Structure, 2003, 11(2): 139-145.
- [24] Abergel C. Spectacular improvement of X-ray diffraction through fast desiccation of protein crystals [J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004, 60(Pt 8): 1413-1416.

【收稿日期】 2021-11-29 【修回日期】 2022-02-01