

研究报告

效应蛋白 LepB 的表达,纯化及其
亚克隆片段的结晶研究*徐安毕^{1,2} 黄来强^{1,2**}

(1 清华大学生命科学学院 北京 100084 2 清华大学深圳研究生院 深圳 518055)

摘要 为了研究嗜肺军团菌通过其效应蛋白发挥的致病机理,效应蛋白的结构和生物学功能研究是至关重要的。我们构建了效应蛋白 LepB 全长载体 PFastBac1,应用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统成功表达了全长 LepB 蛋白,并构建 9 个 LepB 亚克隆的原核表达载体 PGEX-1,通过 GST 亲和层析,离子交换层析,凝胶过滤层析,纯化得到了纯度较高的蛋白片段。通过悬滴气相扩散法进行蛋白结晶筛选,获得了效应蛋白 LepB 片段 480~679 的蛋白晶体,为解析效应蛋白 LepB 的结构和生物学功能研究奠定基础。

关键词 效应蛋白 LepB 结晶

中图分类号 Q816

LepB 是嗜肺军团菌通过四型分泌系统分泌的一个效应蛋白^[1],嗜肺军团菌通过四型分泌系统向宿主细胞内分泌底物效应蛋白,进而改变宿主细胞内的环境,包括借助效应蛋白的功能改变宿主细胞的内外环境、胞内运输方式等^[2],保护自己不被宿主消化,并通过改变宿主细胞的细胞周期,延缓细胞凋亡速度,获得理想的胞内增殖环境,待病原菌在 LCV 内包装繁殖成功,最后,效应蛋白 LepB 可以帮助其从宿主细胞中逃逸^[3,4],进行下一轮的繁殖。

嗜肺军团菌是以高效复制体 LCV (legionella-containing vacuole) 的形式,通过宿主细胞的胞吞作用被转运到宿主细胞内,为避免被胞内的溶酶体识别和消化,首先对高效复制体 LCV 进行伪装。胞内管泡运输的分选,主要由 rab 家族蛋白来完成,是将管泡消化还是继续存留,取决于管泡分选蛋白 rab 家族。嗜肺军团菌借助 rab 家族来伪装自己。通过效应蛋白 LidA 结合胞内蛋白 rab1^[5],并将其带到自我包装的 LCV 表面。

之后,借助宿主细胞的能量物质,完成自我增殖,并最终逃离宿主细胞。在这个过程中,有研究发现,效应蛋白 LepB 的突变体可以延长 rab1 在 LCV 上的滞留时间。LepB 效应蛋白含有 Rab1 特异 GAP 活性,但是它与现有的 Rab-GAP 活性蛋白没有序列相似性。在效应蛋白 SidD 将 Rab1 的 AMP 脱去后^[6-7],LepB 发挥 Rab-GAP 活性,将 Rab1-GTP 水解为 Rab1-GDP 的非活性状态^[8]。非活性状态的 Rab1-GDP 进入下一个循环,继续结合 LidA,并附着到新的 LCV 表面以达到伪装自己,不被宿主细胞降解,进入新一轮的自我增殖,同时,Rab1 得到重复利用^[6,8-10]。

另外,LepB 的突变体展现出复制缺陷的现象,而 SidD,或者 SidM 的突变体没有这样的现象^[6-7],说明,LepB 在自我复制中还扮演重要的角色。效应蛋白 LepB 或者 LepA 的突变体,还有另外一个现象,即它们的突变体不能复制增殖,不能从宿主细胞中逃逸出来,说明 LepB 和 LepA 在帮助自我逃离宿主细胞中有重要作用^[4]。

LepB 本身是一个具有 1 229 个氨基酸的分子量比较大的蛋白,猜测在其结构中含有多个结构域,具有多

收稿日期:2014-03-19 修回日期:2014-04-02

* 国家自然科学基金资助项目(31130063)

**通讯作者,电子邮箱:huanglq@tsinghua.edu.cn

个功能。这让我们对其结构的研究十分好奇,因此,试图通过蛋白质晶体学的方法去解析它的结构。借助昆虫表达系统,获得了全长的 LepB 蛋白,但没有筛选到晶体。通过原核表达系统表达了它的 9 个片段,最终筛选得到了片段 480~679 的蛋白晶体,对晶体进行了优化,得到了生长比较规则的蛋白晶体。

1 材料与方法

1.1 实验材料

原核表达载体 pGEX-1、真核表达载体 pFastBac™ 1、表达菌株大肠杆菌 BL21-DE3、大肠杆菌 DH5 α 、昆虫细胞 Sf21、军团菌基因组 DNA 由本研究室保存;细胞培养基 Sf-900 III SFM 购自 Gibco 公司,转染试剂均购自 Invitrogen 公司,蛋白结晶筛选试剂盒购自 hampton 公司,各种限制性内切酶、T4 连接酶、高保真 DNA 聚合酶及 DNA Marker 购自大连宝生物工程公司;其它试剂均为国产或进口分析纯产品。

1.2 实验方法

1.2.1 LepB-PFastBac1 真核表达载体的构建 提取军团菌基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板,设计引物扩增全长 LepB 基因,通过 BamH I/Xho I 酶切,连接入具有同样酶切位点的 pFastBacTM1 载体,构建真核载体 LepB- pFastBacTM1。LepB-PGEX-1/GST 原核表达载体的构建。以真核载体 LepB- pFastBacTM1 为模板,设计引物扩增 LepB 各片段,构建原核表达载体的 LepB 亚克隆。

1.2.2 全长 LepB 在 Sf21 昆虫细胞中的表达 真核载体 LepB- pFastBacTM1 转化 DH10 感受态细胞,37℃ 复苏 5h,可将全长 LepB 重组到 DH10 中,得到 LepB 杆状病毒重组质粒。在六孔板中均匀铺好密度为 1×10^6 的 sf21 细胞。取 1 μ g 重组质粒与 6 μ l 转染试剂混合,加入 400 μ l Sf900 培养基,28℃ 放置 30min 后,加入六孔板中铺好密度为 1×10^6 的 sf21 细胞中,28℃ 放置,完成转染。转染 3d 后,离心取上清得到 p1 病毒,在 50ml 平板中铺好 1×10^6 的 sf21 细胞,加入 600ul 侵染扩增病毒 p1,28℃ 放置 3d 后,离心取上清得到 p2 病毒,取 1ml p2 病毒加入装有 30ml sf21 细胞的锥形瓶中,2d 后检测表达量。超声破碎后跑 SDS-PAGE 胶鉴定蛋白表达效率。

1.2.3 LepB 亚克隆在原核细菌中的表达 将原核表达载体 LepB-PGEX-1/GST 转化入大肠杆菌 BL21-DE3 中,37℃ 加入 IPTG 诱导。12% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳,初步鉴定表达情况。

1.2.4 蛋白的表达与纯化 离心收集表达菌株和细胞,超声破碎后,高速离心取上清,通过 Ni²⁺ 亲和层析柱得到初步纯化的 LepB 全长蛋白,通过 GST 亲和层析柱得到初步纯化的 LepB 亚克隆蛋白,之后分别过阴离子交换柱 Q 柱和凝胶过滤层析柱 superdex200,提高蛋白纯度。

1.2.5 LepB 及其亚克隆蛋白的晶体生长和优化 将蛋白用离心浓缩器浓缩到 10mg/ml,借助 Hampton 蛋白质结晶试剂盒,采用悬滴法生长初晶。得到初步晶体后,根据生长条件,设置 PH 梯度优化,温度梯度优化,蛋白浓度梯度优化的方法,在 4℃ 条件下进行晶体的优化。

2 结果

2.1 目的基因的 PCR 扩增、鉴定及克隆

以嗜肺军团菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,在 3 900bp 处出现 1 条特异性很强的条带(图 1),与预期的全长 LepB 基因大小相符。LepB 全长 PCR 产物经 BamH I 和 Xho I 酶切后,分别连入真核表达载体 PFastBac1TM1/6xHis 和原核表达载体 PGEX-1/GST。载体构建之后,转化 DH5 α ,PCR 鉴定阳性克隆,测序纠正突变。以全长基因载体为模板进行 PCR,得到 LepB 的 9 个亚克隆片段产物。亚克隆片段产物分别经 BamH I 和 Xho I 酶切连入原核表达载体 PGEX-1/GST,转化 DH5 α ,PCR 鉴定阳性克隆。

2.2 全长 LepB 在昆虫细胞中的表达及纯化

试图利用 PGEX-1/GST 载体尝试在细菌中表达全长 LepB,但是没有得到可溶性好的蛋白。改变表达方法,尝试在真核昆虫细胞中表达。将全长 LepB 进行病毒包裹后,转染昆虫细胞 sf21,28℃,120r/min,48h 后,SDS-PAGE 胶观察到可溶性蛋白(如图 2),经过阴离子交换柱后,得到了纯度较高的全长 LepB 蛋白(如图 3),凝胶过滤层析 super dex 200 纯化,1L sf21 细胞可以表达得到 10mg 的蛋白。虽然蛋白纯度很好,但发现蛋白比预期的要大(如图 4),Hampton 晶体筛选试剂盒筛选晶体,未发现晶体生长。可能是全长蛋白折叠不好,聚合的原因。

2.3 LepB 各片段 GST 标签重组载体在 BL21 菌株中的表达测试

加入 0.5mmol/L 浓度的 IPTG,37 度诱导 4 h 后,进行超声破碎,过亲和层析 GST 柱后,取 10 μ l GST 进行

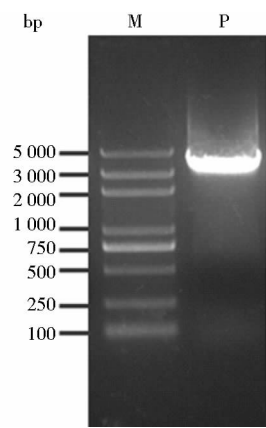


图1 LepB 全长基因的 PCR
Fig. 1 Agarose gel(1%) electrophoresis of PCR amplification of *Legionella pneumophila* *LepB* gene
M: DNA molecular weight marker;
P: The full length of *LepB* gene (3900 bp)

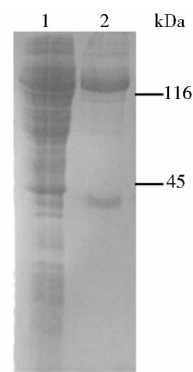


图2 全长 LepB His 标签融合表达
Fig.2 Expression and purification of soluble histidine-tagged LepBrecombinant protein under optimized conditions

The samples were analyzed by SDS-PAGE with Coomassie blue staining. 1: Cell lysate supernatant after induction of the *LepB* gene expression; 2: Purified recombinant protein eluted with 250mM imidazole

SDS-PAGE 电泳观察各个片段表达情况。可以看到,截取的这 9 个片段均有表达,只是表达量的高低有比较大的差异。对 9 全长蛋白个片段进行大量表达纯化和晶体结晶试验。

2.4 LepB 各片段蛋白的晶体初筛和蛋白表达条件的优化

利用 Hampton 蛋白质结晶试剂盒,采用悬滴法,对各个片段进行晶体初步筛选,发现其中一个片段 LepB-

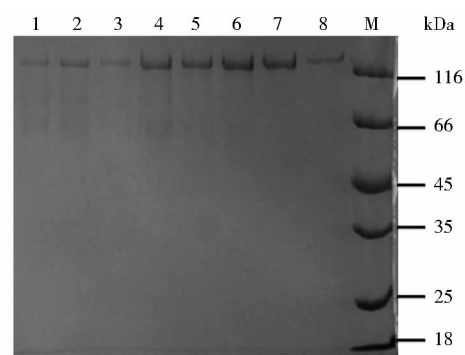


图3 阴离子交换层析(Q 柱)纯化后的蛋白
Fig.3 Further purification of full length LepB through ion exchange Q column
1 ~ 8, Purified LepB protein eluted with NaCl of different concentrations; M, protein molecular weight marker

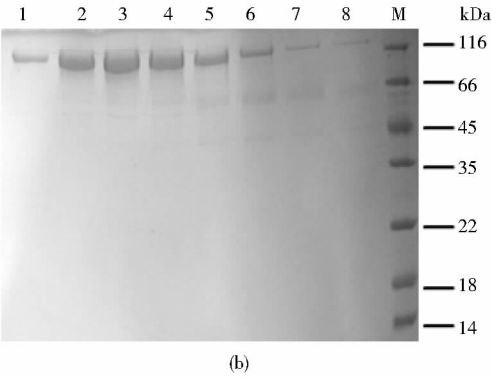
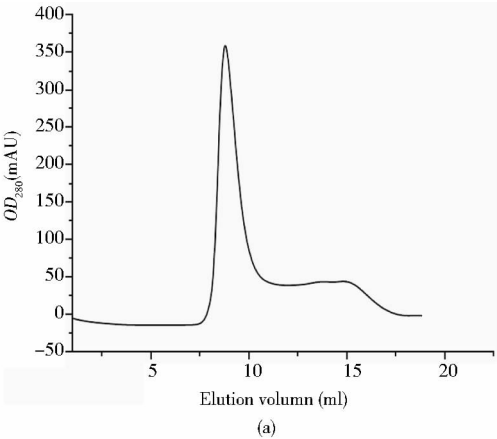


图4 凝胶过滤层析 superdex 200 纯化蛋白
Fig.4 Size exclusion chromatography(SEC) of LepB by superdex 200 (GEHealthcare)
(a) The parameters of the column (HR10/300, GEHealthcare) were $V_0 = 1.1$ ml and $V_t = 9.862$ ml. SDS-PAGE of LepB (b) 1-8: Purified LepB after being analyzed by SEC; M: Molecular weight standards

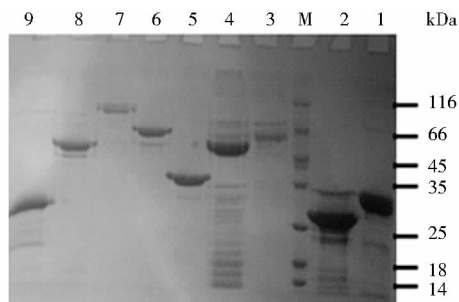


图5 LepB 各个片段在细菌中的表达鉴定

Fig.5 Protein purification for sub clone of LepB in Bacteria

1:1017-1229; 2:1-224; 3:1-556; 4:224-729; 5:480-868; 6:480-1113; 7:480-1229; 8:729-1229; 9:480-679. M: Molecular weight standards

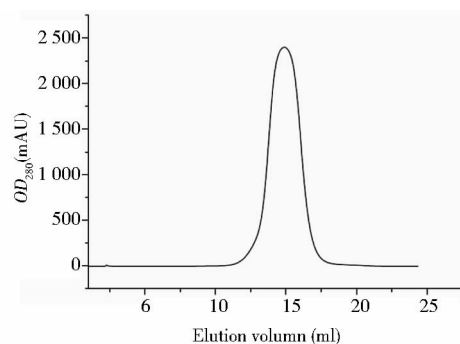
480-679 的有晶体生长。经摸索在 0.3mmol/L 浓度的 IPTG, 18℃ 诱导 10 h 的重组蛋白 LepB-480-679-GST 的表达量最高。用 Ppase 切除 GST 标签后, 经过亲和层析 GST 柱和阴离子交换柱 Q 柱后, 进行 Superdex200 凝胶过滤层析 (如图 6), 得到了均一性和纯度均更高的 LepB-480-679 蛋白, 以备晶体优化。

2.5 LepB 片段 480-679 的结晶

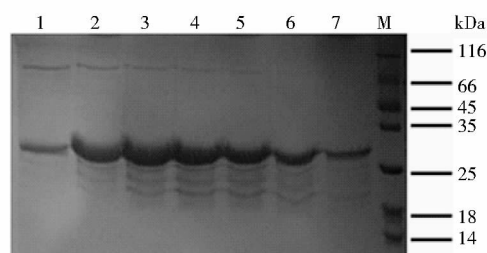
为了获得生长更好的蛋白晶体, 根据生长条件, 设置 PH 梯度优化, 温度梯度优化, 蛋白浓度梯度优化的方法, 在 4 度条件下, 0.1mol/L Tris PH7.1, 0.78mol/L $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 的缓冲液中得到了生长形状比较规则的晶体 (如图 7)。

3 讨论

军团菌肺炎以及庞蒂亚克热在全球都有发现, 其元凶就是嗜肺军团菌。通过其 IVB 型毒力分泌系统^[1], 嗜肺军团菌实现侵染宿主的目的。目前, 嗜肺军团菌已经成为“病原菌-宿主相互作用”的重要研究模型, 通过向宿主细胞分泌效应蛋白完成自己在宿主体内的增殖。嗜肺军团菌向宿主细胞内分泌的底物效应蛋白有 150 多种^[2, 11], 嗜肺军团菌能够借助自身分泌的这些效应蛋白, 改变宿主细胞的胞内运输途径, 让自己吞噬泡的内外环境发生改变, 达到伪装自我吞噬泡的作用, 不被宿主识别和消化, 同时干扰宿主的细胞周期, 抑制宿主细胞的凋亡, 逃避宿主细胞的防御功能, 实现嗜肺军团菌在宿主细胞内增殖。当嗜肺军团菌增殖并成熟后, 效应蛋白还可以帮助军团菌从宿主细胞中逃逸, 如 lepA 和 LepB。LepB 蛋白在嗜肺军团菌繁



(a)



(b)

图6 凝胶过滤层析 superdex 200 纯化后的 LepB 片段 480-679 蛋白样品

Fig.6 Size exclusion chromatography of LepB truncation 480-679

(a) The parameters of the column (HR10/300, GEHealthcare) were $V_0 = 1.09 \text{ ml}$ and $V_t = 15.032 \text{ ml}$. SDS-PAGE of LepB truncation 480-679 (b) 1-7: Purified LepB-480-679 after being analyzed by SEC; M: Molecular weight standards

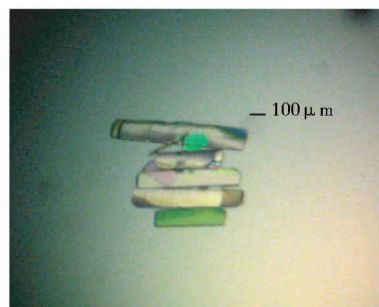


图7 LepB-480-679 蛋白晶体

Fig.7 LepB truncation 480-679 forms crystal by hanging drop method

殖过程中起着十分重要的作用, 当嗜肺军团菌被以吞噬泡的形式进入宿主体内后, 为避免被宿主识别和消化, 通过效应蛋白 LidA 将 Rab1 带到吞噬泡表面, 但是宿主体内的 Rab1 是有限的, 为了获得更多的 Rab1, 同时也是为了释放出更多自由的效应蛋白 LidA 去进行下一个循环的吞噬泡表面伪装, 就需要将 Rab1 从已经

繁殖成熟的吞噬泡表面脱离下来, LepB 效应蛋白这个时候发挥其 Rab-GAP 的活性, 使 Rab1-GTP 水解为 Rab1-GDP, 从吞噬泡表面脱离, 供另外的效应蛋白 LidA 利用, 再次将 Rab1 带到新的吞噬泡表面实现自我伪装^[6, 8-9]。当嗜肺军团菌在吞噬泡内增殖成熟后, 需要从宿主体内逃离出来。有研究表明, 当突变效应蛋白 LepB 和 LepA 后, 增殖成熟的嗜肺军团菌不能从宿主体内逃离^[3-4], 进行新一轮的繁殖, 同时, LepB 的突变体还展现出复制缺陷的现象。

嗜肺军团菌底物效应蛋白的功能成为病原微生物学的研究热点。对嗜肺军团菌效应蛋白 LepB 的研究可以帮助我们更深层次的研究宿主免疫系统, 同时可以阐明病原细菌的一些致病机理。

参考文献

- [1] Segal G, Feldman M, Zusman T. The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *FEMS microbiology reviews*, 2005, 29:65-81.
- [2] Ninio S, Roy C R. Effector proteins translocated by *Legionella pneumophila*: strength in numbers. *Trends in microbiology*, 2007, 15:372-380.
- [3] Chen J, de Felipe K S, Clarke M, et al. *Legionella* effectors that promote nonlytic release from protozoa. *Science*, 2004, 303: 1358-1361.
- [4] Chen J, Reyes M, Clarke M, et al. Host cell-dependent secretion and translocation of the LepA and LepB effectors of *Legionella pneumophila*. *Cellular microbiology*, 2007, 9:1660-1671.
- [5] Neunuebel M R, Mohammadi S, Jarnik M, et al. *Legionella pneumophila* LidA affects nucleotide binding and activity of the host GTPase Rab1. *Journal of bacteriology*, 2012, 194: 1389-1400.
- [6] Machner M P, Isberg R R. Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. *Developmental Cell*, 2006, 11:47-56.
- [7] Neunuebel M R, Chen Y, Gaspar A H, et al. De-AMPylation of the small GTPase Rab1 by the pathogen *Legionella pneumophila*. *Science*, 2011, 333:453-456.
- [8] Ingmundson A, Delprato A, Lambright D G, et al. *Legionella pneumophila* proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature*, 2007, 450:365-369.
- [9] Liu Y, Luo Z Q. The *Legionella pneumophila* effector SidJ is required for efficient recruitment of endoplasmic reticulum proteins to the bacterial phagosome. *Infection and immunity*, 2007, 75: 592-603.
- [10] Schoebel S, Oesterlin L K, Blankenfeldt W, et al. RabGDI displacement by DrrA from *Legionella* is a consequence of its guanine nucleotide exchange activity. *Molecular Cell*, 2009, 36: 1060-1072.
- [11] Isberg R R, O' Connor T J, Heidtman M. The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7:13-24.

The Expression, Purification and Studying for Crystallization of Subclone of Effector Protein LepB

Xu An-bi HUANG Lai-qiang

(1 School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

(2 Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China)

Abstract The structural study of effector protein is important for studying the pathogenesis of *legionella pneumophila*. A construct for plasmid of LepB-PFastBac1-GST and 9 constructs for plasmids of LepB-truncation-PGEX-1 - GST were successfully constructed and induced to express in insect cell or bacteria BL21 (DE3), the obtained recombinant protein was purified and crystallized by the vapor diffusion method. The crystal of the truncation of LepB 480-679 grows. The results provide a basis for helping resolve the structure of LepB and further research work on the pathogenesis of *legionella pneumophila*.

Key words Effector protein LepB Crystallization