

DOI:10.13350/j.cjpb.230504

• 论著 •

鼠伤寒沙门菌 YaaA 蛋白的原核表达与纯化 及蛋白晶体的培养*

戴元吉,张敏,程龙云,许祥冬,华浩然,王伟玮**,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 通过建立大肠埃希菌 BL21(DE3)原核表达系统,得到高纯度及构象均一的 YaaA 蛋白,筛选蛋白晶体,为其结构解析及相关功能研究奠定基础。方法 利用生物信息学方法对 YaaA 蛋白的性质及结构进行预测和分析。使用 PCR 的方法从沙门菌基因组中扩增 *yaaA* 基因,将其克隆到原核表达载体 pG101 上,获得重组质粒 pG101-YaaA。利用 DE3 培养后,IPTG 合并氯霉素进行 YaaA 蛋白的可溶性诱导表达,通过镍离子亲和层析柱、阴离子交换柱以及分子筛凝胶层析柱得到高纯度的目标蛋白。纯化的 YaaA 蛋白采用悬滴气象扩散法获得其蛋白晶体。通过胰蛋白酶酶切试验测定 YaaA 蛋白核心区及稳定性。结果 YaaA 蛋白基因成功克隆到 pG101 载体上,并在 DE3 中可溶性表达。通过层析纯化得到高纯度、形态均一的 YaaA 蛋白,相对分子质量约为 30×10^3 ,浓度为 6 mg/mL,纯度约为 98%。YaaA 蛋白的稳定性较好,晶体培养条件为:0.2 mol/L Ammonium sulfate,0.1 mol/L BIS-TRIS,pH 6.5,25% (w/v) Polyethylene glycol 3350。结论 通过原核表达、亲和层析及凝胶过滤层析获得高纯度且构象单一的 YaaA 蛋白,该蛋白稳定性较好,可用于蛋白晶体的筛选,为 YaaA 的结构解析和功能验证奠定了基础。

【关键词】 鼠伤寒沙门菌;YaaA 蛋白;原核表达;晶体培养;蛋白稳定性

【中图分类号】 R378.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)05-0513-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 May;18(5):513-518.]

Prokaryotic expression and purification of YaaA protein from *Salmonella typhimurium* and culture of protein crystal

DAI Yuanji, ZHANG Min, CHENG Longyun, XU Xiangdong, HUA Haoran, WANG Weiwei, LI Bingqing (Department of Pathogen Biology, School of Clinical and Basic Medicine (Institute of Basic Medicine), Shandong First Medical University (Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250000, China)***

【Abstract】 **Objective** The high-purity and conformational YaaA protein was obtained by a prokaryotic expression system for *Escherichia coli* BL21 (DE3). The crystal screening of the protein was further carried out to lay the foundation for its structural analysis and related functional research. **Methods** The basic properties and solubility of *Salmonella* YaaA protein were predicted by Expas. Then the homologous model of *Salmonella* YaaA structure was established by SWISS MODEL, which based on the structure of the *E. coli* YaaA protein (PDB code: 5ACJ). The structure Analysis of YaaA was used Coot and PyMoL. The *yaaA* gene was amplified from the genome of *Salmonella* by PCR and then cloned into the prokaryotic expression vector pG101 to obtain the recombinant plasmid pG101-YaaA. Subsequently, *E. coli* BL21 (DE3) was used to express the YaaA protein. The soluble expression of YaaA protein was induced by IPTG and chloramphenicol after being cultured with DE3. Then the high purity YaaA protein was purified by nickel ion affinity chromatography, anion exchange column and molecular sieve gel chromatography column. YaaA protein crystals were obtained by hanging drop meteorological diffusion method. Furthermore, the stability of YaaA protein was determined by trypsin digestion test, and its core region was determined. **Results** The *Salmonella* YaaA protein consists of 257 amino acids, its the relative molecular weight is about 30 ku, its isoelectric point is 5.89, and there is no signal peptide. According to bioinformatics analysis, YaaA may be a DNA binding protein. The *yaaA* gene was successfully cloned into the pG101 vector and expressed soluble in DE3. The YaaA protein with high purity and uniform morphology was obtained by chromatography, the relative molecular weight was about 30×10^3 , the concentration was 6 mg/mL, and the purity was about 98%. YaaA is stable when the concentration of trypsin is less than 2 mg/mL, and its crystal culture conditions are as follows: 0.2 mol/L Ammonium sulfate, 0.1 mol/L BIS-TRIS, pH 6.5 Polyethylene glycol

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 32170034,81902038)。

** **【通讯作者】** 李冰清, E-mail: bingqingsdu@163.com; 王伟玮, E-mail: wangweiwei_fly@126.com

【作者简介】 戴元吉(1995-),男,吉林人,硕士在读。主要研究方向:细菌致病基因相关研究。E-mail:18410418021@163.com

3350. **Conclusion** In this study, YaaA protein with high purity and single conformation was obtained by prokaryotic expression, affinity chromatography and gel filtration chromatography. The protein has good stability and can be used for protein crystal screening, which lays a foundation for structural analysis and functional verification of YaaA.

【Key words】 *Salmonella typhimurium*; YaaA protein; Prokaryotic expression; Crystal cultivation; Protein stability

鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*, STM)是一种胞内寄生革兰阴性杆菌,能通过受污染的食物感染人类和其他动物,从而引发相关的胃肠道疾病,主要症状为腹痛、腹泻、恶心、呕吐、昏迷等,严重者可引起菌血症甚至死亡^[1-2]。据报道,在过去的十年中,鼠伤寒沙门菌已导致全球约65万人死亡,并被列为“对公共卫生最具威胁”的细菌之一^[3-4]。因此对鼠伤寒沙门菌致病机制的研究有利于寻找新的治疗手段,具有重要的公共卫生意义。

鼠伤寒沙门菌入侵宿主后被巨噬细胞吞噬,被吞噬的沙门菌在含有沙门菌的囊泡(*Salmonella* containing vacuole, SCV)内生存和复制,随巨噬细胞扩散到全身各处,从而引发全身多器官感染^[5-6]。因此,沙门菌在巨噬细胞内的生存、繁殖是其致病的关键因素。巨噬细胞作为重要的免疫细胞,面对沙门菌的入侵会做出一系列的反应,如溶酶体降解通路的激活、细胞质迅速酸化,抗菌肽的表达和分泌,活性氧自由基(ROS)的加速产生等,以期实现对沙门菌的快速杀灭^[7-10]。其中,ROS的氧化杀伤系统最为重要。巨噬细胞一方面激活NADPH氧化酶,发生氧爆作用,产生大量ROS;另一方面,通过将ECSIT蛋白泛素化,使线粒体在吞噬泡附近富集,产生更多的ROS。巨噬细胞内高浓度的ROS能够进入细菌细胞并大量积累,若得不到及时清除,ROS可通过Fenton反应转化为剧毒的羟自由基($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} \cdot + \text{OH} \cdot$)^[11-16],造成DNA断裂和蛋白羰基化等严重损伤,从而导致细菌死亡^[17]。

在生存压力下,沙门菌进化出多种机制逃避巨噬细胞的ROS杀伤。其中,鼠伤寒沙门菌中存在一种YaaA的蛋白,属于DUF328家族,是一种重要的未知功能蛋白。该蛋白在不同菌株间高度保守,在大肠埃希菌和鼠伤寒沙门菌中该蛋白基因的同源性高达83.33%。大肠埃希菌YaaA的表面有一处凹槽,附近氨基酸残基呈对称分布,为DUF328家族高度保守氨基酸,该凹槽处带电性及其宽度均符合DNA结合蛋白特性。此外,YaaA还含有两个 α -螺旋,为其他DNA结合蛋白的高度保守结合区域。因此,YaaA及DUF328家族可能具有结合DNA的活性。研究表明,大肠埃希菌中的YaaA受调节子OxyR的调控。OxyR是 H_2O_2 的效应器,调控参与氧化应激反应大多数基因的表达,其中包括YaaA的激活^[18-20]。YaaA

在环境 H_2O_2 浓度升高时表达上调,并通过未知机制降低细胞内 Fe^{2+} 的浓度,从而减少 Fe^{2+} 和 H_2O_2 反应导致的细胞毒性^[21-22]。此外,大肠埃希菌YaaA敲除菌与DNA损伤菌的菌落形态特征表现一致^[23],说明YaaA对氧化应激条件下的DNA修复和维护起重要作用。因此,鼠伤寒沙门菌YaaA蛋白可能有助于其逃避巨噬细胞ROS的氧化杀伤,研究YaaA蛋白的具体结构及功能,有助于阐明鼠伤寒沙门菌的胞内生存和致病机制。

本研究以生物信息学分析为基础,建立鼠伤寒沙门菌YaaA蛋白大肠埃希菌BL21(DE3)原核表达系统,通过 Ni^{2+} 亲和层析法、阴离子交换柱法、分子筛凝胶层析法进行蛋白纯化,得到高纯度及构象均一的YaaA蛋白,筛选蛋白晶体,并通过胰蛋白酶酶切实验寻找蛋白稳定核心区,为其结构解析及相关功能研究奠定基础。

材料和方法

1 材料

1.1 菌株和载体 重组YaaA质粒(pGl01-YaaA)由济南博尚公司全基因合成(载体pGl01为PET15b改造而成,氨苄青霉素抗性,N端含有 $6 \times \text{His}$ 标签和PPase酶切位点)。感受态大肠埃希菌BL21(DE3)细胞由本实验室制备保存。

1.2 主要试剂和仪器 Yeast extract和Tryptone购于美国OXOID公司;IPTG,氨苄青霉素和Tris-HCL购于北京索莱宝公司;蛋白Marker购于南京诺维赞公司;PMSF和考马斯亮蓝染液购于北京碧云天公司;蛋白晶体筛选试剂盒购于美国Hampton Research公司。AKTA纯化仪, Ni^{2+} 亲和层析柱,阴离子交换柱及分子筛凝胶层析柱均购于美国GE公司。

2 方法

2.1 YaaA蛋白的生物信息学预测分析 从UniProt数据库获得YaaA蛋白的氨基酸序列,使用Expasy预测蛋白的基本性质和可溶性。利用SWISS MODEL进行鼠伤寒沙门菌YaaA结构的同源建模,采用Coot和PyMOL进行YaaA的结构分析。

2.2 pGl01-YaaA重组质粒的构建及验证 YaaA重组质粒(pGl01-YaaA)由济南博尚公司全基因合成。将重组质粒转入感受态细胞BL21(DE3)中,涂布在含氨苄青霉素抗性的LB固体琼脂板上,37℃培养过夜。

挑取单菌落接种到具有氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中,37 °C 培养至 A_{600} 值为 0.4~0.6 时,加入 0.6 mmol/L 的 IPTG 诱导 1h,SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的表达。YaaA 蛋白表达菌株 pGl01-YaaA/BL21 (DE3)由济南博尚公司进行测序验证。

2.3 YaaA 蛋白的大量表达 pGl01-YaaA/BL21 (DE3)经过夜培养活化后,按 1:1000 转接至 LB 液体培养基中,在 37 °C、200 r/min 条件下培养至 A_{600} 值为 0.4~0.6,随后降温至 16 °C,用 0.6 mmol/L IPTG 诱导 12 h,并在 11 h 时加入终浓度为 0.1 mol/L 氯霉素。

2.4 YaaA 蛋白的纯化 取表达 YaaA 蛋白的 YaaA-pGl01/BL21(DE3)在 4 °C、4 000 r/min(离心半径 32 cm)条件下离心,收集菌体,用 Load buffer(25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,200 mmol/L NaCl)重悬后加入终浓度为 1.5 mmol/L 的胰蛋白酶抑制剂 PMSF,超声破碎(150 W,10 min),破碎菌液置 4 °C 下 14 000 r/min(离心半径 5 cm)离心 50 min,取上清(可溶性 YaaA 蛋白存在于上清液中),利用 Ni^{2+} 亲和层析柱、阴离子交换柱和分子筛凝胶层析柱依次对目的蛋白 YaaA 进行纯化。 Ni^{2+} 亲和层析柱使用前用 Elution buffer (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,100 mmol/L NaCl,250 mmol/L 咪唑)洗脱 2 次,Load buffer 洗脱 2 次,放于 4 °C 备用。将收集的重组菌破碎上清液倒入已预处理的 Ni^{2+} 亲和层析柱中,用 Load buffer 冲脱两次以去除杂蛋白。目的蛋白 YaaA 用 10 mL Elution buffer 洗脱,然后用 QA 溶液(25 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0)稀释 5~10 倍。上样至平衡后的阴离子交换柱(Q 柱),用 QA 溶液和 QB 溶液(25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,150 mmol/L NaCl)进行梯度洗脱,洗脱蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析。收集蛋白纯度较高的洗脱蛋白液,浓缩至 2 mL。浓缩蛋白进行分子筛凝胶层析纯化,经 SD 溶液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0)梯度洗脱后,依据蛋白洗脱峰位置收集对应蛋白并进行 SDS-PAGE 电泳分析,对纯度和浓度较高的 YaaA 蛋白液采用 NanDrop 微量核酸蛋白浓度测定仪测量蛋白浓度,按每管 50 μ L 分装,液氮速冻的-80 °C 保存。

2.5 EMSA 试验 将蛋白稀释至 5mg/mL,再用 CAB(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,100 mmol/L NaCl,1 mmol/L MgCl,1 mmol/L DTT,4% 甘油)作 5 倍梯度稀释,蛋白浓度依次为 5、1、0.2、0.04、0.008、0.0016 mg/mL。每个滴度取 5 μ L 与 10 μ L CAB buffer 混合后上样,80 V 恒压低温 200 min,分别经 gel-Red 和考马斯亮蓝染色后观察结果。

2.6 晶体培养使用 Hampton Research 公司生产的

12 种晶体初筛试剂盒(Crystal Screen,Crystal Screen II,SaltRx,SaltRx II,Index-1-96,PEG/ION,PEG/ION II,Natrix2-116,Natrix 2-117,PEGRx,PEGRx II),采用气象扩散法进行晶体普筛,蛋白浓度约为 6 mg/mL。培养条件及步骤:池液孔中加入 105 μ L 结晶缓冲液,蛋白孔中加入 1.05 μ L 蛋白和 1.05 μ L 结晶缓冲液,混合均匀,封板,18 °C 静置培养,观察晶体生长情况。

2.7 胰蛋白酶酶切试验 蛋白表面暴露的赖氨酸和精氨酸容易被胰蛋白酶切开,而内部的不会被切开。通过使用不同的胰蛋白酶进行酶切试验,可以确定 YaaA 蛋白的稳定核心区。本研究选取浓度为 2 mg/mL 的 YaaA 蛋白进行胰蛋白酶酶切试验,胰蛋白酶浓度分别为 10、2 mg/mL、1 L、0.33、0.11、0.033 mg/mL……0.0013 mg/mL。将 YaaA 蛋白与分别与不同浓度的胰蛋白酶均匀混合,4 °C 反应 30 min,经 SDS-PAGE 电泳后分析 YaaA 蛋白是否存在稳定核心区。

结果

1 YaaA 的生物信息学分析及 EMSA 验证

YaaA 蛋白共 257 个氨基酸,相对分子质量约为 30×10^3 ,等电点为 5.89,无信号肽。由于 yaaA 基因在沙门菌和大肠埃希菌中同源性高达 85%,因此使用 SWISS-MODLE 对沙门菌 YaaA 进行同源建模,以大肠埃希菌 YaaA 蛋白(PDB 号:5ACJ)结构作为构建模板。构建的沙门菌 YaaA 蛋白模型中存在 DNA 结合口袋,并且在结合口袋及表面带有带正电的氨基酸(图 1A),即 55 位的赖氨酸和 63 位精氨酸(图 1B)。经生物信息学分析 YaaA 可能为 DNA 结合蛋白。

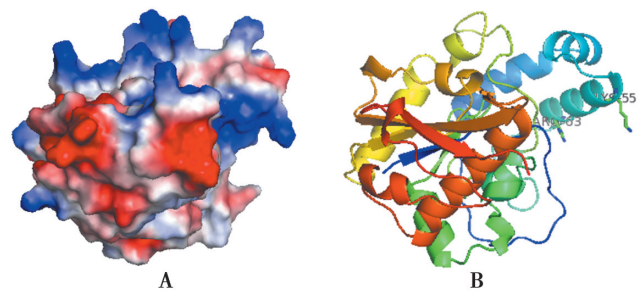


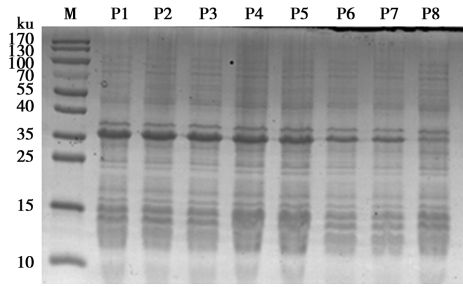
图 1 YaaA 蛋白表面带电情况、卡通结构(A)及 55 位 K 和 63 位 R 显示的棍状结构(B)

Fig.1 Protein surface electrification(A) and Protein Cartoon Structure and 55 K and 63 R Rod Structure(B)

2 重组质粒 pGl01-YaaA 的验证

重组质粒 pGl01-YaaA 转化入感受态细胞 BL21 (DE3)后,在含氨苄青霉素的 LB 固体平板上挑取 8 个单菌落,分别命名 P1、P2…P8,经 IPTG 诱导表达后进行 SDS-PAGE 电泳结果如图 2 所示,P1-P5 菌株均表达相对分子质量约为 30×10^3 的目的蛋白。选取重

组菌 P2 进行测序验证,结果正确。



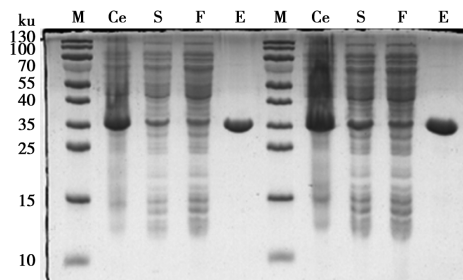
M 蛋白分子质量标准(Protein marker)

图 2 重组菌株 P1-P8 表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.2 Identification results of different positive recombinants by SDS-PAGE

3 YaaA 蛋白的大量表达与纯化

挑取鉴定正确的重组菌 P2,于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养,经 16 °C 过夜诱导表达可溶性 YaaA 蛋白,诱导剂为 IPTG 或 IPTG 合并氯霉素。菌体破碎,高速离心后收集上清液,利用 Ni²⁺ 亲和和层析柱纯化表达蛋白,纯化蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果如图 3。与 IPTG 单独诱导表达 YaaA 相比, IPTG 合并氯霉素作为诱导剂增加了 YaaA 蛋白的可溶性表达,纯化后获得纯度较高的 YaaA 蛋白。取纯化蛋白进行阴离子交换柱纯化,根据蛋白洗脱出峰位置(图 4),选取目的蛋白主要存在的 10-16 管进行 SDS-PAGE 电泳分析(图 5)。最后将收集的蛋白浓缩至 2 mL 并进行分子筛凝胶层析柱纯化(图 6),SDS-PAGE 电泳显示目的蛋白主要存在于 9-17 管中(图 7)。重组质粒转化 BL21(DE3)诱导表达 YaaA 蛋白量较大且可溶性高。YaaA 蛋白经上述 3 种方法纯化后的纯度为 98%,浓度约为 5.086 mg/mL,体积为 2.2 mL。纯化蛋白液氮速冻后 -80 °C 保存。



M 蛋白分子质量标准 Ce 重组菌 IPTG 诱导 12 h 全菌蛋白 S 重组菌 IPTG 诱导 12 h 超声破碎上清 F 重组菌镍柱洗穿蛋白 E 镍柱纯化的 YaaA 蛋白

图 3 重组菌 IPTG/IPTG+氯霉素诱导后经 Ni²⁺亲和和层析纯化的 YaaA 蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

M Protein Marker Ce Whole cell lysate of pG101-YaaA/BL21 (DE3) S Cellular lysate supernatant of pG101-YaaA/BL21 (DE3) F Non Ni²⁺ binding protein of pG101-YaaA/BL21 (DE3) E Purified protein YaaA

Fig.3 SDS-PAGE electrophoretogram of YaaA protein after induction by IPTG/IPTG+chloramphenicol and purification by Ni²⁺ affinity chromatography

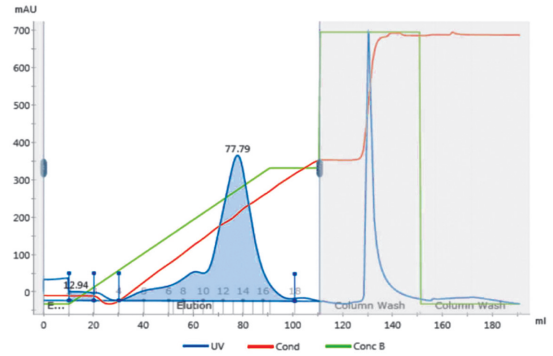
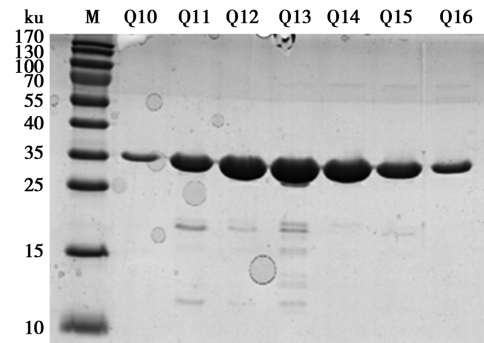


图 4 YaaA 蛋白的阴离子交换柱纯化

Fig.4 Purification of YaaA protein by anion exchange column



M 蛋白分子质量标准 Q10-16 10-16 管蛋白洗脱液

图 5 阴离子交换层析纯化的 YaaA 蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

M Protein marker Q10-16 10-16 tube protein eluent

Fig.5 SDS-PAGE analysis of protein yaaA after anion exchange column purification chromatography

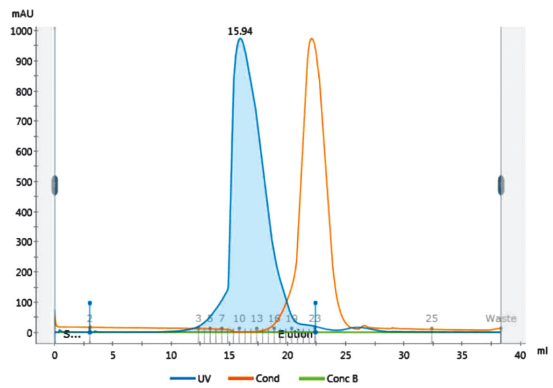
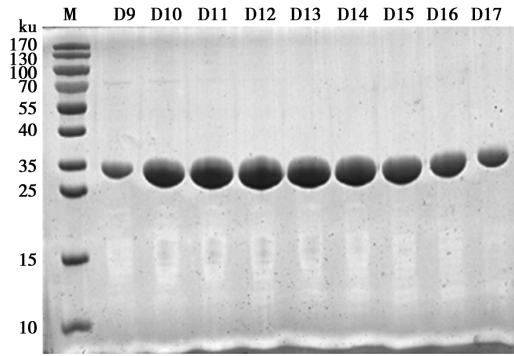


图 6 YaaA 蛋白的分子筛纯化

Fig.6 Molecular sieve purification of YaaA protein

4 EMSA 试验结果

收集的 YaaA 蛋白经 NanDrop 测定, $A_{260}/A_{280} = 0.743 (>0.5)$,符合 DNA 结合蛋白性质。经 EMSA 试验验证, YaaA 在 1.0mg/mL 时便可看见清晰的 DNA 条带(图 8A),其位置与考马斯亮蓝染色蛋白位置(8B)一致,可以确认 8A 中的 DNA 条带为 YaaA 蛋白所携带。



M 蛋白分子质量标准 D9-D17 9-17 管蛋白洗脱液
图 7 分子筛纯化的 YaaA 蛋白 SDS-PAGE 电泳分析
M Protein marker D9-D17 9-17 tube protein eluent
Fig. 7 SDS-PAGE analysis of YaaA Protein Purified by Molecular Sieve

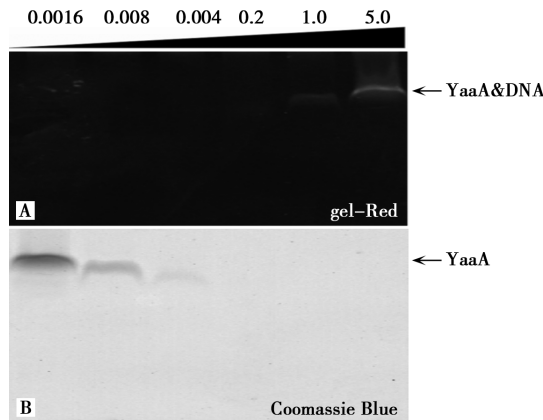


图 8 YaaA EMSA 试验的 gel-Red 染色 (A) 及 EMSA 考马斯亮蓝染色 (B)
Fig. 8 EMSA gel Red staining (A) and brilliant blue staining (B)

5 晶体培养

用 Hampton Research 晶体培养试剂盒进行 YaaA 蛋白的晶体培养,培养约 2 周后在 0.2 mol/L Ammonium sulfate, 0.1 mol/L BIS-TRIS pH 6.5, 25% (w/v) Polyethylene glycol 3350 条件下观察到有晶体长出。在该条件下进行多次优化,优化后仍未得到理想的晶体。获得的 YaaA 晶体虽然为单晶,但为薄片状(图 9)。



图 9 YaaA 蛋白晶体
Fig. 9 YaaA protein crystal

6 胰蛋白酶切试验结果

薄片状的蛋白晶体若进行 X 射线衍射则会导致晶体被击穿,因此须对 YaaA 蛋白进行胰蛋白酶酶切验证。胰蛋白酶酶切可去除 YaaA 蛋白的不稳定区域,保留蛋白的稳定区域。结果显示,在加入浓度 ≥ 2 mg/mL 胰蛋白酶后, YaaA 蛋白才发生切割(图 10),表明 YaaA 比较稳定,可采用全长进行晶体优化。

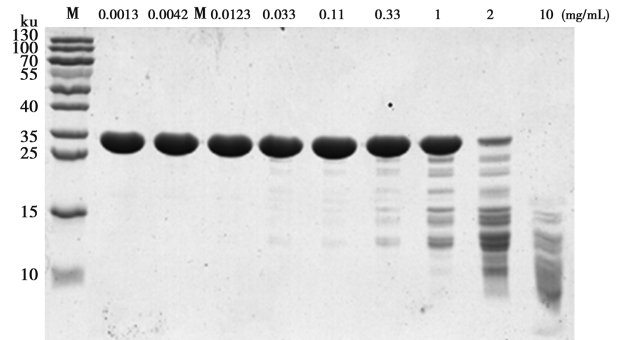


图 10 YaaA 蛋白胰蛋白酶切试验结果
Fig. 10 Trypsin digestion experiment of YaaA protein

讨论

作为成功的胃肠道病原体,沙门菌具有多种可被激活的抗氧化蛋白,帮助其应对宿主巨噬细胞的 ROS 攻击,在 SCV 中生存和繁殖。沙门菌有 3 种过氧化氢酶(KatE、KatG 和 KatN), 3 种抗氧化蛋白(AhpC、TsaA 和 Tpx) 和 4 种 SOD(SodA、SodB、SodCI 和 SodCII)。在氧化应激条件下,细胞中的转录调控因子 RpoS、OxyR 等被激活,开启抗氧化蛋白的高效表达,抗氧化蛋白通过一系列反应将 $O^{\cdot -}$ 还原分解成无毒的 H_2O ^[18]。如转录因子 OxyR 含有一对半胱氨酸残基,能被 H_2O_2 氧化形成二硫键,激活下游抗氧化蛋白 Dps、SodCII、AhpC 和 AhpF 等的表达^[19]。在氧化应激条件下,沙门菌内抗氧化蛋白 Dps 大量积累,整合 Fe^{2+} 防止其与 H_2O_2 发生 Fenton 反应^[20-21]。此外,由沙门菌致病岛 2 编码的 T3SS 在 SCV 内表达,可将效应蛋白转运至宿主细胞质中,干扰功能性 NADPH 氧化酶复合物在沙门菌中的定位,从而降低沙门菌内 H_2O_2 浓度,发挥抗氧化作用^[22-23]。

YaaA 在沙门菌抵抗氧化杀伤机制中发挥重要作用。研究表明,在氧化应激条件下大肠埃希菌 YaaA 主要调节胞内 Fe^{2+} 水平的作用, Fe^{2+} 在 H_2O_2 存在时会通过 Fenton 反应产生大量羟基自由基,导致细菌 DNA 损伤及凋亡^[17,22]。在细菌中,DNA 修复主要与 RecFOR 通路有关,该通路主要针对修复 DNA 断裂的双链,YaaA 可能参与其他与 RecFOR 通路重叠的 DNA 修复通路,在 DNA 氧化应激时对 DNA 修复有着重要的作用^[24]。YaaA 的结构含有一段特殊的结构

域-HhH,该结构域是DNA非特异性结合区域,通常存在于合成或者修复的蛋白结构中^[25]。HhH的结构域含有一个小槽,该小槽与DpdC催化PreQ代谢的结构域相吻合。分析其结合的偏好性,表明该小槽应该结合B型双螺旋DNA^[12,26]。表明YaaA具有DNA结合活性,可能具有未发现的催化酶功能。然而YaaA究竟是简单的结合DNA还是作为底物作用于DNA仍不清楚。因此解析鼠伤寒沙门菌中的YaaA结构及其功能对于了解鼠伤寒沙门菌在宿主内的生存机制具有重要意义,并且为解答DUF328家族在氧化应激时的DNA修复功能提供了新的机制。

本研究通过重组技术成功构建了YaaA重组表达载体。在目的蛋白的诱导表达过程中,为了减少包涵体的形成,提高蛋白的可溶性表达,加入了氯霉素。但由于氯霉素的作用靶标为细菌核糖体,会抑制目的蛋白的合成,因此在细胞收获前约1h添加,使已形成包涵体的部分重组蛋白再溶解,据估计氯霉素的加入可提高约30%的可溶性蛋白产量。诱导表达产物经Ni²⁺亲和层析、阴离子交换层析和分子筛层析,获得状态均一、蛋白性质良好、纯度较高的YaaA蛋白。YaaA蛋白稳定性较好,存在稳定的核心区。用该蛋白进行YaaA晶体普筛,经过晶体优化,得到单晶性较好的晶体,但晶体过薄,不宜进行X射线衍射,应继续优化晶体并在合适条件下加additive和deteron,以期得到状态良好的单晶,通过结构解析进一步解答YaaA的抗氧化机制。

【参考文献】

- [1] 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.
- [2] Smith SI, Seriki A, Ajayi A. Typhoidal and non-typhoidal *Salmonella* infections in Africa[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(12):1913-1922.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] LaRock DL, Chaudhary A, Miller SI. *Salmonellae* interactions with host processes[J]. Nat Rev Microbiol, 2015, 13(4):191-205.
- [6] Jong HK, Parry CM, van der Poll T, et al. Host-pathogen interaction in invasive *Salmonellosis* [J]. PLoS Pathog, 2012, 8(10):e1002933.
- [7] Sholpan A, Lamas A, Cepeda A, et al. *Salmonella spp.* quorum sensing: an overview from environmental persistence to host cell invasion[J]. AIMS Microbiol, 2021, 7(2):238-256.
- [8] Fang FC, Frawley ER, Tapscott T, et al. Bacterial Stress Responses during Host Infection[J]. Cell Host Microbe, 2016, 20(2):133-143.
- [9] Pradhan D, Devi Negi V. Stress-induced adaptations in *Salmonella*: A ground for shaping its pathogenesis[J]. Microbiol Res, 2019, 229:126311.
- [10] Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. *Salmonellae* interplay with host cells[J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(1):53-66.
- [11] Doherty AJ, Serpell LC, Ponting CP. The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24(13):2488-2497.
- [12] Anjem A, Varghese S, Imlay JA. Manganese import is a key element of the OxyR response to hydrogen peroxide in *Escherichia coli* [J]. Mol Microbiol, 2009, 72(4):844-858.
- [13] Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro[J]. Science, 1988, 240(4852):640-642.
- [14] Jang S, Imlay JA. Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes[J]. J Biol Chem, 2007, 282(2):929-937.
- [15] Jang S, Imlay JA. Hydrogen peroxide inactivates the *Escherichia coli* Isc iron-sulphur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate[J]. Mol Microbiol, 2010, 78(6):1448-1467.
- [16] Varghese S, Wu A, Park S, et al. Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of Fur protein to control free-iron levels in *Escherichia coli* [J]. Mol Microbiol, 2007, 64(3):822-830.
- [17] Sinha K, Das J, Pal PB, et al. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis [J]. Arch Toxicol, 2013, 87(7):1157-1180.
- [18] Aussel L, Zhao W, Hbrard M, et al. *Salmonella* detoxifying enzymes are sufficient to cope with the host oxidative burst[J]. Molecular microbiology, 2011, 80(3):628-640.
- [19] Zheng M, Aslund F, Storz G. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation[J]. Science, 1998, 279(5357):1718-1722.
- [20] Halsey TA, Vazquez-Torres A, Gravidahl DJ, et al. The ferritin-like Dps protein is required for *Salmonella enterica serovar Typhimurium* oxidative stress resistance and virulence [J]. Infection and immunity, 2004, 72(2):1155-1158.
- [21] Pacello F, Ceci P, Ammendola S, et al. Periplasmic Cu, Zn superoxide dismutase and cytoplasmic Dps concur in protecting *Salmonella enterica serovar Typhimurium* from extracellular reactive oxygen species [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2008, 1780(2):226-232.
- [22] Gallois A, Klein JR, Allen LA, et al. *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded type III secretion system mediates exclusion of NADPH oxidase assembly from the phagosomal membrane[J]. J Immunol, 2001, 166(9):5741-5748.
- [23] Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, et al. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase[J]. Science, 2000, 287(5458):1655-1658.
- [24] Pag s V. Single-strand gap repair involves both RecF and RecBCD pathways[J]. Curr Genet, 2016, 62(3):519-521.
- [25] Doherty AJ, Serpell LC, Ponting CP. The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24(13):2488-2497.
- [26] Seo SW, Kim D, Szubin R, et al. Genome-wide Reconstruction of OxyR and SoxRS Transcriptional Regulatory Networks under Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12 MG1655 [J]. Cell Rep, 2015, 12(8):1289-1299.

【收稿日期】 2022-11-11 【修回日期】 2023-02-01