

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00969

霍乱弧菌 HutX 蛋白的晶体结构

李 君¹, 巩 晶², 杨勇骥^{1*}, 黄 球^{3*}

1. 第二军医大学基础部生物物理学教研室, 上海 200433
2. 山东大学医学院癌症研究中心, 济南 250012
3. 山东大学生命科学院微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

[摘要] **目的** 获取纯化的霍乱弧菌 HutX 蛋白晶体和衍射数据。**方法** 通过基因克隆和蛋白表达得到 HutX 蛋白, 通过镍柱亲和层析、Source Q 阴离子交换柱层析和 Superdex 200 分子筛柱层析等纯化所得蛋白, 并用蛋白质印迹法进行验证。将所获蛋白进行结晶条件筛选及悬滴优化, X 线衍射分析所得晶体的结构。**结果** 蛋白质印迹分析间接证明所得到的蛋白为 HutX 蛋白, 并得到 HutX 蛋白的晶体及衍射数据。**结论** 为进一步研究 HutX 的蛋白结构及其在霍乱弧菌亚铁血红素利用机制中发挥的作用提供了参考。

[关键词] 霍乱弧菌; HutX 蛋白; X 线结晶学; 血红素利用

[中图分类号] R 378.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)09-0969-05

Crystal structure of *Vibrio cholerae* HutX protein

LI Jun¹, GONG Jing², YANG Yong-ji^{1*}, HUANG Yan^{3*}

1. Department of Bio-physics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Center of Cancer Research, School of Medicine, Shandong University, Ji'nan 250012, Shandong, China
3. State Key Laboratory of Microbial Technology, School of Life Science, Shandong University, Ji'nan 250100, Shandong, China

[Abstract] **Objective** To obtain purified *Vibrio cholerae* HutX and its diffraction data. **Methods** Protein HutX was obtained by gene cloning and protein expression, purified by nickel sepharose affinity chromatography, anion exchange chromatography (source Q), and molecular sieve chromatography (Superdex 200), and identified by Western blotting analysis. Then the obtained protein was subjected to crystallization condition screening and hanging drop optimization. The obtained crystal structure was analyzed by X-ray diffraction method. **Results** Western blotting analysis indirectly indicated that the obtained protein was HutX protein. Then the HutX crystal and its diffraction data were obtained in the present study. **Conclusion** The findings of the present study pave a way for future research on the crystal structure and function of HutX protein and its role in heme utilization of *Vibrio cholerae*.

[Key words] *Vibrio cholerae*; HutX protein; X-ray crystallography; heme utilization

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(9):969-973]

霍乱弧菌属于弧菌属, 是革兰阴性海洋菌, 通过被感染的海产品或受污染的水感染人类, 引起严重的水样腹泻^[1]。霍乱弧菌利用宿主体内的铁离子繁殖到一定程度才能引起疾病。铁离子是霍乱弧菌生存、增殖的必要元素^[2], 摄取宿主体内的亚铁血红素是霍乱弧菌获取铁离子的一种重要方式。霍乱弧菌利用亚铁血红素内铁元素的机制已成为国内外研究的热点之一^[3-4]。

目前, 人们已经识别出几种与霍乱弧菌利用宿主体内亚铁血红素相关的蛋白^[5]: HutA, 血红素受体; TonB 和 EXbBD; HutB, 周质结合蛋白; HutCD, 内膜通透酶; HutW、HutX 和 HutZ。近年来, 更多的研究关注亚铁血红素进入霍乱弧菌胞质内的利用情况, 发现 *hutW*、*hutX*、*hutZ* 同属于同一个启动子; HutZ 蛋白与霍乱弧菌对亚铁血红素的优化利用有关^[3]; HutW 蛋白在亚铁血红素利用中发挥的作用

[收稿日期] 2012-02-26 **[接受日期]** 2012-06-21

[基金项目] 高等学校博士学科专项科研基金(20110131120045)。Supported by Special Fund for Doctorate Candidate in Higher Institutions (20110131120045)。

[作者简介] 李 君, 硕士生。E-mail: 838121309@qq.com

* 通信作者(Corresponding authors)。Tel: 021-81870923, E-mail: yjyang22@163.com; Tel: 0531-88362551, E-mail: huangyan@sdu.edu.cn

还不清楚^[6];与 HutZ 蛋白一同表达的 HutX 蛋白是霍乱弧菌宿主体内铁利用系统的重要组成部分,与亚铁血红素的利用相关,但是其晶体结构和功能尚不清楚^[4]。

2009年,Suits等^[7]研究了 HutX 的同源蛋白 ChuX 的晶体结构。ChuX 蛋白包含 574 个氨基酸,每个不对称单位中含有 2 个二聚体,分别由 AB 和 CD 组成。每个单体均存在一个由 3 个 α 螺旋组成的亚铁血红素结合域,对亚铁血红素有较好的亲和力。

本研究利用大肠杆菌 BL21 为表达菌株,对霍乱弧菌蛋白 HutX 进行基因克隆及蛋白质过量表达,通过镍柱亲和层析、Source Q 阴离子交换柱层析和 Superdex 200 分子筛柱层析等方法对 HutX 蛋白进行纯化,得到 HutX 蛋白结晶,并通过 X 线衍射分析其晶体结构,为进一步了解该蛋白的结构和功能提供参考。

1 材料和方法

1.1 基因克隆 我们以 O1 群霍乱弧菌 El Tor 生物型菌株 N16961 的基因组为模板进行 PCR 扩增,5'端引物为 GAA ATT CAT ATG TCA TTA CAA CAG CAA GTC,3'端引物为 GAA ATT CTC GAG TCA GTG TTG TTG CTG CAT TGC,退火温度为 56℃,延伸 1 min,扩增 30 个循环,扩增体系为 100 μ l。使用 *Nde* I 和 *Xho* I 对 PCR 产物进行限制性酶切(酶切体系为 48.9 μ l: 40 μ l PCR 产物,2 μ l *Nde* I,2 μ l *Xho* I,4.9 μ l 10 \times 酶切缓冲液),之后将其连接入质粒 pET-15b(连接体系为 15 μ l: 9 μ l 酶切片段,2 μ l 载体,3 μ l 5 倍连接缓冲液,1 μ l 连接酶)。将 15 μ l 连接产物加入到 100 μ l 大肠杆菌 BL21(DE3) 的感受态细胞中进行转化,涂布于含有 100 mg/L 氨苄青霉素的固体 LB 培养基中,置于 37℃ 培养箱中培养 12~14 h,挑取单菌落,进行菌落 PCR(扩增体系为 20 μ l,其余 PCR 条件同上),将 PCR 阳性的菌落进行蛋白表达检测,即将菌体接种于 1 ml 含有氨苄抗生素的液体 LB 培养基,37℃ 振荡培养至光密度(D_{600})为 0.6~0.8,加入 2 μ l 母液浓度为 0.6 mol/L 的异丙醇基硫代 β -D-半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactopyranoside, IPTG) 37℃ 诱导 1 h,将菌体 95℃ 加热裂解,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)检测,当

菌落 PCR 及蛋白表达均为阳性时才能确定为阳性克隆(对照组菌体采用空载体 pET-15b 转化的大肠杆菌),将此克隆送济南博尚生物科技有限公司测序,并使用质粒快速抽提试剂盒(Tiagen Biotech)提取阳性克隆的质粒并保存菌种(保存 1 ml,包含 50% 的过夜培养菌液和 50% 甘油)。

1.2 蛋白质的过量表达与纯化

1.2.1 蛋白质过量表达 挑取阳性克隆置于 5 ml 的含有氨苄青霉素的固体 LB 培养基中,在 37℃ 振荡培养 5~6 h;接入 1 L 液体培养基中(氨苄青霉素浓度为 100 μ g/ml),37℃ 振荡培养;当菌体浓度 D_{600} 为 0.6~0.8 时,降温 1 h 至 15℃,加入母液浓度为 0.6 mol/L 的 IPTG 200 μ l,诱导约 12 h,使重组蛋白表达。

1.2.2 镍柱亲和层析(Ni-NTA) 将菌液 5 128 \times g、4℃ 离心 15 min,弃去上清,收获菌体;加入重悬溶液(25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100 mmol/L NaCl),振荡菌体细胞;加入蛋白酶抑制剂苯甲酸磺酰氟(phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF)至终浓度为 1 mmol/L;使用超声方法(宁波新芝超声波细胞粉碎仪 JY98-III N)破碎菌体细胞;细胞裂解液经 28 370 \times g、4℃ 离心 45 min,收集上清液。将上清液导入平衡后的镍柱(基质为 Chelating Sepharose Fast Flow,购于 GE Healthcare),利用悬浮缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl)进行清洗去除杂蛋白,再用含 25 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl、500 mmol/L imidazole 的缓冲液进行洗脱。对纯化过程中的蛋白样品取样进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.3 Source Q 阴离子交换柱层析 将镍柱洗脱得到的蛋白液导入平衡后的 Source Q 阴离子交换柱(Source 15Q HR 16/10,购买于 GE Healthcare),并采用 0~500 mmol/L NaCl 梯度洗脱。对纯化过程中的蛋白样品进行 SDS-PAGE 检测。Source Q 阴离子交换的 2 个缓冲液分别为 QA(25 mmol/L Tris-HCl)和 QB(25 mmol/L Tris-HCl, 1 mol/L NaCl)。

1.2.4 Superdex 200 分子筛柱层析 将 Source Q 收集到的蛋白溶液采用截留值为 10 000 的滤膜浓缩至 2 ml;将 2 ml 蛋白液导入平衡的 Superdex 200(Superdex 200 HR 10/30,购买于 GE Healthcare)中。对纯化过程中的蛋白样品取样进行 SDS-PAGE 检测。Superdex 200 采用的缓冲液是 10 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl。

1.3 蛋白验证 目前对 HutX 蛋白的研究尚处于起步阶段,其特异性抗体未见报道。本实验纯化后获得的蛋白均带有 His 标记,因此,我们对 His 蛋白进行蛋白质印迹法以验证所获取蛋白是否为目标蛋白 HutX。进行电泳前 1 h,取匀浆液 100 μ l 加入样本缓冲液 100 μ l,均匀混合。煮沸 5 min,待蛋白质充分变性后,SDS-PAGE 90 min,设定恒压 80 V,待样品跑入下层胶后设定恒压 120 V。尼龙膜转渍 2 h,设定恒流 300 mA。转膜完成后用 TTBS(Tris buffer saline with Tween-20,含 1% 脱脂奶粉)将膜冲洗 10 min,后室温下浸泡于封闭缓冲液中 1 h,然后用 TTBS 冲洗,倒掉后加入一抗,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,冲洗后加入二抗结合 1 h,冲洗掉后,加入 ECL 试剂,用定影液、显影液在暗房中洗出胶片。

使用 His 标记特异切割酶切除掉一部分获取蛋白的 His 标记后按上述步骤行蛋白质印迹实验,作为对照。

1.4 蛋白结晶及结构衍射 将 Superdex 200 收集到的融合蛋白(N 端含有 His 标记)以坐滴法进行结晶条件的筛选^[8](14 个结晶试剂盒,购于 Hampton research),最终在 crystal screen 22(0.2 mol/L 乙酸钠,0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 pH 8.5,30% 聚乙二醇 4000)得到了较好的块状晶体,并对此条件下晶体通过改变沉淀剂梯度和 pH 值的方式进行悬滴优化。另外我们将蛋白和亚铁血红素混合(蛋白摩尔量:亚铁血红素摩尔量=1:2),在相同的条件下(0.2 mol/L 乙酸钠,0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液,pH 8.5,30% 聚乙二醇 4000)进行悬滴优化。最后我们将优化得到的晶体用于 X 线衍射^[9](X 线衍射

采用波长为 0.939 2 \AA ,1 $\text{\AA}=10^{-10}$ m)。

2 结果

2.1 蛋白表达与纯化结果 HutX-pET15b(克隆的蛋白片段为 N3-C164,即从 N 端的第 3 位氨基酸至 C 末端第 164 位氨基酸,蛋白相对分子质量约为 198 000)经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化后的结果如图 1 所示。

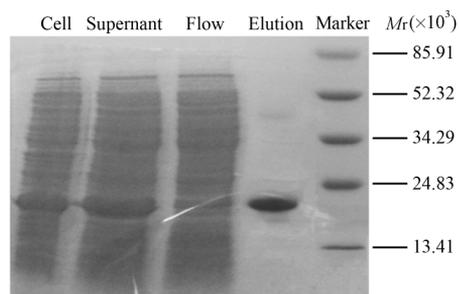


图 1 HutX (N3-C164) 蛋白的可溶性和经 Ni-NTA 的纯化结果

Fig 1 Solubility analysis and purification of HutX (N3-C164) protein by Ni-NTA

根据总蛋白质和可溶性蛋白质的电泳结果,提示 HutX 是可溶的,而且能够很好地结合在 Ni-NTA 亲和层析柱上,并且能够被洗脱溶液洗脱下来。洗脱下来的蛋白从 SDS-PAGE 电泳结果来看纯度较高。值得注意的是,从亲和层析柱上洗脱下来的蛋白没有颜色,根据文献结果^[3,6]推测 HutX 没有结合底物 Heme。将洗脱下来的蛋白质移至合适的盐浓度,上样到已经平衡好的 Source Q 柱,用于确定 HutX 在离子交换柱上的性状及均一性,HutX 经 Source Q 纯化后的结果如图 2 所示。

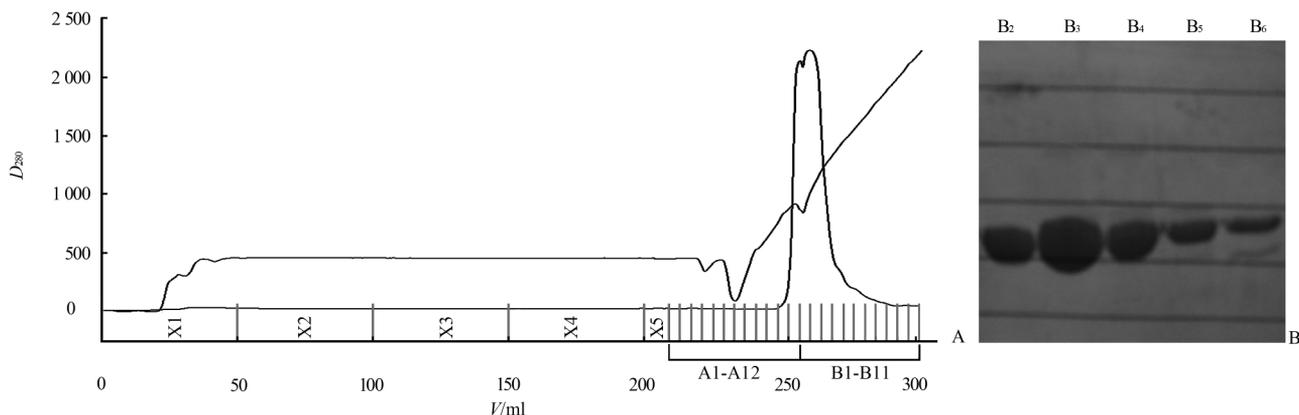


图 2 HutX (N3-C164) 经离子交换柱 Source Q 纯化的结果

Fig 2 Purification of HutX (N3-C164) protein by anion-exchange chromatography

A: Elution profile of HutX (N3-C164) during anion-exchange chromatography; B: SDS-PAGE of samples near the elution peak. X1-X5, A1-A12, and B1-B11 are the numbers of collecting tube

蛋白经 Source Q 纯化出现了 2 个蛋白峰,表明此蛋白的性质可能并不是很均一,取蛋白浓度较高的蛋白峰 B2、B3 和 B4 三管(第二个蛋白峰),使用超滤杯浓缩(截留值 10 000)到 2 ml。通过凝胶过滤层析进行下一步的纯化,纯化结果如图 3 所示。合并 C4、C5、C6、C7 和 C8 共 2.5 ml 蛋白质,用于晶体生长。

从 Superdex 200 的图谱上可以看到单一的蛋白峰,峰型匀称,表明蛋白性状较好,没有出现聚集而导致蛋白不纯。从 SDS-PAGE 结果来看,蛋白纯度较高(>95%),可以用于后续的结晶工作。经过测量用于结晶的蛋白浓度约为 8 mg/ml,共收集蛋白 16 mg。

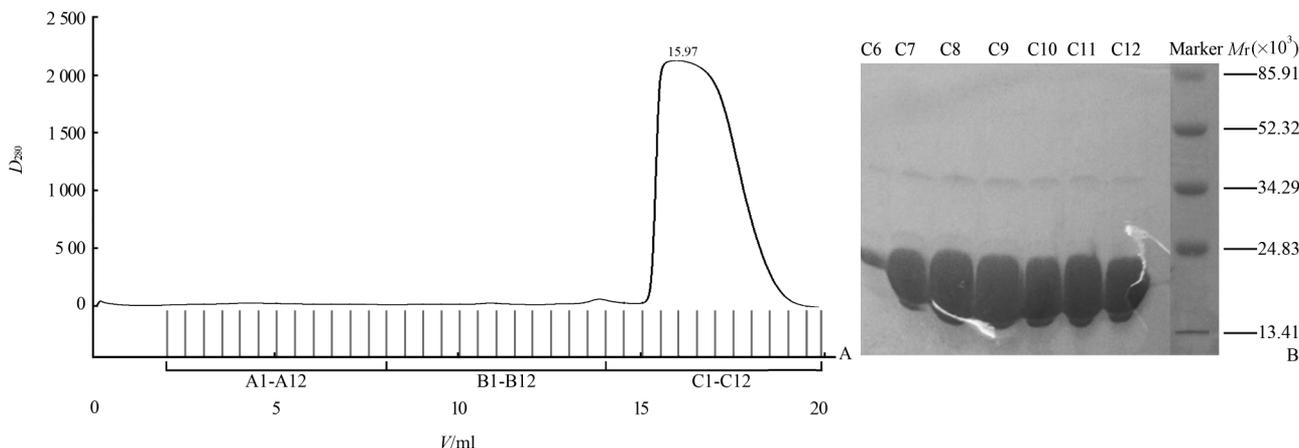


图 3 HutX (N3-C164) 经凝胶过滤层析纯化后的结果

Fig 3 Purification of HutX (N3-C164) protein by gel filtration chromatography

A: Elution profile of HutX (N3-C164) during Gel filtration chromatography; B: SDS-PAGE of samples near the elution peak. A1-A12, B1-B11, and C1-C12 are the numbers of collecting tube

2.2 蛋白纯化后蛋白质印迹鉴定结果 实验组发现 His 蛋白有明显表达,而对照组中则没有相应相对分子质量蛋白的表达(图 4)。

200 分子筛等方法纯化获取高纯度 HutX 蛋白并进行蛋白质印迹实验验证,同时通过 X 线衍射得到其衍射数据,为下一步研究 HutX 的生物学特性和在霍乱弧菌获取、保存、利用亚铁血红蛋白中的作用提供了结构基础。

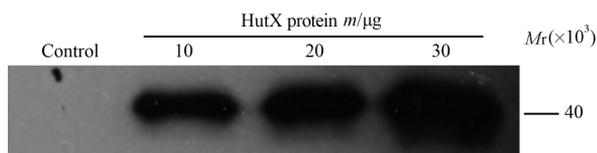


图 4 蛋白纯化后蛋白质印迹鉴定结果

Fig 4 Western blotting analysis of the purified protein

2.3 HutX 蛋白结晶和 X 线衍射分析 通过悬滴法对结晶条件进行优化,最终获得了较好的单晶并用于 X 线衍射,衍射分辨率约为 2.0 \AA (图 5)。如图 5 所示,衍射点小而圆,没有拖尾现象。我们对几张衍射图利用软件进行积分发现,晶体的空间群为 C2221,晶胞参数为 $a = 50.092, b = 168.996, c = 81.790, \alpha = \beta = \gamma = 90.000$ 。

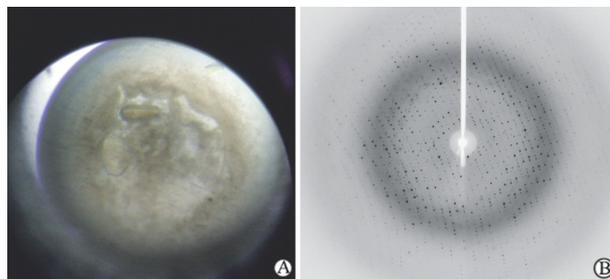


图 5 HutX (N3-C164) 晶体图及衍射图

Fig 5 Crystal and X-ray diffraction of HutX (N3-C164)

A: The crystal of HutX (N3-C164); B: X-ray diffraction of HutX (N3-C164). Original magnification: $\times 100$

3 讨论

本实验通过将霍乱弧菌含 *hutX* 基因片段的重组质粒转化大肠杆菌中表达获取 HutX 蛋白,通过镍柱亲和层析、Source Q 阴离子交换和 superdex

对照组胶片未显影表明所加抗体与 His 标记特异性结合,而目标蛋白并未与抗体结合。虽然由于 HutX 蛋白特异性抗体的缺乏,本实验并不能直接证明获得蛋白为 HutX,但是鉴于在目标蛋白上加入 His 标记,蛋白质印迹实验间接证明了所获取的

蛋白是 HutX 蛋白。蛋白质印迹获得的蛋白相对分子质量为 40 000,是其理论相对分子质量 20 000 的 2 倍,所以可推测 HutX 蛋白是以二聚体的形式存在的。该结果与 Suits 等^[7]的实验结果一致。Suits 等^[7]对 HutX 的同源蛋白 ChuX 的蛋白结构研究发现,ChuX 蛋白在蛋白结构中间的 β 带相互作用形成二聚体。

本实验曾尝试将 HutX 蛋白溶液与亚铁血红素溶液混合在一起得到 HutX-亚铁血红蛋白共结晶。HutX 蛋白与亚铁血红素的混合液呈黄色,说明本实验中得到的无色透明 HutX 蛋白溶液中 HutX 蛋白并未结合亚铁血红素。进一步将 HutX-亚铁血红素混合溶液纯化,仍得到无色透明溶液,说明纯化过程中(Source Q 阴离子交换和 superdex 200 分子筛)过滤了亚铁血红素。由此可推测 HutX 蛋白对亚铁血红素的亲和力不强。由于尚无 HutX 蛋白对亚铁血红素亲和力的研究报道,本实验通过光谱学实验和等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry,ITC)测量 HutX 与亚铁血红素的结合常数以验证我们的推测。在本实验条件下,未获得 HutX-亚铁血红蛋白共结晶。

Source Q 阴离子交换后我们得到了 2 个蛋白峰,表明这 2 个峰值的蛋白某些性状存在不同点,为了保证结晶时蛋白的性状均一,本实验只收集了主峰蛋白进行结晶。尽管尚不能解释蛋白性状的不同,但是本实验说明离子纯化是获取高纯度 HutX 蛋白的关键步骤。而高纯度的蛋白和合适的克隆片段(N3-C164)是获取 HutX 蛋白晶体的关键。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] O'Malley S M, Mouton S L, Occhino D A, Deanda M T, Rashidi J R, Fuson K L, et al. Comparison of the heme iron utilization systems of pathogenic vibrios[J]. J Bacteriol, 1999, 181: 3594-3598.
- [2] Henderson D P, Wyckoff E E, Rashidi C E, Verlei H, Oldham A L. Characterization of the *Plesiomonas shigelloides* genes encoding the heme iron utilization system[J]. J Bacteriol, 2001, 183: 2715-2723.
- [3] Wyckoff E E, Schmitt M, Wilks A, Payne S M. HutZ is required for efficient heme utilization in *Vibrio cholerae*[J]. J Bacteriol, 2004, 186: 4142-4151.
- [4] Sikora A E, Beyhan S, Bagdasarian M, Yildiz F H, Sandkvist M. Cell envelope perturbation induces oxidative stress and changes in iron homeostasis in *Vibrio cholerae*[J]. J Bacteriol, 2009, 191: 5398-5408.
- [5] Wyckoff E E, Mey A R, Payne S M. Iron acquisition in *Vibrio cholerae*[J]. Biometals, 2007, 20(3-4): 405-416.
- [6] Septer A N, Wang Y L, Ruby E G, Stabb E V, Dunn A K. The haem-uptake gene cluster in *Vibrio fischeri* is regulated by fur and contributes to symbiotic colonization[J]. Environ Microbiol, 2011, 13: 2855-2864.
- [7] Suits M D, Lang J, Pal G P, Couture M, Jia Z. Structure and heme binding properties of *Escherichia coli* O157: H7 ChuX [J]. Protein Sci, 2009, 18: 825-838.
- [8] DeTitta G T, Luft J R. Rate of water equilibration in vapor-diffusion crystallization: dependence on the residual pressure of air in the vapor space[J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1995, 51(Pt 5): 786-791.
- [9] Kasai N, Kakudo M. X-ray diffraction by macromolecules[M]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2005: 1-504.

[本文编辑] 尹 茶