

DOI:10.13350/j.cjpb.230306

• 论著 •

鼠伤寒沙门菌效应蛋白 SteC 的原核表达、纯化与晶体培养^{*}

张敏,戴元吉,王方,王伟玮,贾海红,宋楠楠,李翠玲,李冰清^{**},岳盈盈^{**}

(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 鼠伤寒沙门菌效应蛋白 SteC 是沙门菌Ⅲ型分泌系统中唯一的一种激酶,然而其与以往发现的激酶同源性均较低,其发挥激酶功能的机制尚不清楚。本研究通过基因克隆、原核表达截短鼠伤寒沙门菌效应蛋白 SteC-C 端催化结构域,获得纯化蛋白并进行晶体培养,为揭示 SteC 作为激酶催化磷酸化的机制奠定基础。**方法** 以鼠伤寒沙门菌效应蛋白 SteC 生物信息学分析为基础,在 SteC-C 端催化结构域进行片段截取,并将此结构域中仅有的第 276 位半胱氨酸突变为丝氨酸,利用基因克隆技术分别构建 SteC C1-pG101 和 SteC C1_{C276S}-pG101 两种重组质粒,在大肠埃希菌原核体系中进行表达。依次使用镍离子亲和层析柱、凝胶层析柱进行蛋白纯化。使用 12 种晶体试剂盒筛选适合 SteC 活性(Holo)与非活性(Apo)状态晶体生长的条件,从而获得 SteC 不同类型的蛋白质晶体,并使用 additive 试剂盒寻找更利于蛋白晶体生长的条件,从而获得单晶性良好的晶体。**结果** 鼠伤寒沙门菌效应蛋白 SteC C1 催化结构域相对分子质量大小为 19.7×10^3 ,在原核表达体系中蛋白可溶性好、浓度高,但是蛋白性质不稳定存在二聚化现象,其突变体证明 SteC Cys-276 是 SteC C1 导致二聚化的原因。两种蛋白均在 2.0 mol/L Ammonium sulfate, 0.01 mol/L Magnesium sulfate heptahydrate, 0.05 mol/L Sodium cacodylate trihydrate (pH 6.5) 条件结晶,且 SteC C1_{C276S} 晶体结晶时间更快,添加 0.1 mol/L 碘化钠试剂后更有助于蛋白晶体的生长。**结论** 成功构建 SteC C1 及 SteC C1_{C276S} 原核表达系统并获得蛋白进行结晶培养。硫酸铵盐有助于 SteC C1 结构域及其突变体晶体的形成且突变体更容易结晶。SteC C1 结构域蛋白晶体的培养为 SteC 蛋白质空间结构的解析及进一步揭示其催化磷酸化的分子机制奠定了基础。

【关键词】 鼠伤寒沙门菌;效应蛋白;晶体培养;蛋白激酶;SteC

【中图分类号】 R378.22

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)03-0276-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Mar;18(3):276-281,286.]

Prokaryotic expression, purification and crystallization of Salmonella effector protein SteC

ZHANG Min, DAI Yuan-ji, WANG Fang-cheng, WANG Wei-wei, JIA Hai-hong, SONG Nan-nan, LI Cui-ling, LI Bing-qing, YUE Ying-ying (Department of Pathogen Biology, School of Clinical and Basic Medicine, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250000, China)^{***}

【Abstract】 Objective The *Salmonella typhimurium* effector protein SteC is the only kinase in the *Salmonella* type Ⅲ secretion system. However, its homology with previously discovered kinases is low, and its mechanism of kinase function is still unclear. In this study, through gene cloning and prokaryotic expression of the truncated SteC-C terminal catalytic domain of the *Salmonella typhimurium* effector protein, the purified protein was obtained and crystallized, laying the foundation for revealing the mechanism of SteC as a kinase that catalyzes phosphorylation. **Methods** Based on the bioinformatics analysis of the effector protein SteC of *Salmonella typhimurium*, fragments were intercepted in the SteC-C terminal catalytic domain, and the only 276th cysteine in this domain was mutated to serine. Two recombinant plasmids, SteC C1-pG101 and SteC C1_{C276S}-pG101 were constructed by cloning technology, and expressed in the prokaryotic system of *Escherichia coli*. Protein purification was performed using nickel ion affinity chromatography column and gel chromatography column sequentially. Using twelve kinds of crystal kits to screen the conditions suitable for the crystal growth of SteC active (Holo) and inactive (Apo) states, so as to obtain different types of SteC protein crystals. And then using additive kit to find conditions that are more conducive to protein crystal growth, so as to obtain crystal with good single crystallinity. **Results** The relative molecular mass of the *Salmonella typhimurium* effector protein SteC C1 was 19.7×10^3 . In the prokaryotic expression system, the protein had good solubility and high concentration, but the protein was unstable and had dimerization phenomenon. The mutants proved that SteC Cys-276 is responsible for dimerization of

^{*} **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No.31800054,32170034,81902038)。

^{**} **【通讯作者】** 李冰清, E-mail:bingqingsdu@163.com; 岳盈盈, E-mail:yyy0513@163.com

【作者简介】 张敏(1997-,女,山东人,硕士在读。主要研究方向:病原微生物致病机制。E-mail:15662004814@163.com

SteC C1. Both proteins were crystallized under the conditions of 2.0 mol/L Ammonium sulfate, 0.01 mol/L Magnesium sulfate heptahydrate, 0.05 mol/L Sodium cacodylate trihydrate (pH 6.5), and the crystallization time of SteC C1_{C276S} crystal was faster, adding 0.1 mol/L iodide Sodium reagent is more conducive to the growth of protein crystals.

Conclusion The prokaryotic expression system of SteC C1 and SteC C1_{C276S} was successfully constructed and the protein was obtained for crystallization. Ammonium sulfate helps the crystal formation of SteC C1 domain and its mutants, and the mutants are easier to crystallize. The culture of SteC C1 domain protein crystals laid a foundation for analyzing the spatial structure of SteC protein and further revealing the molecular mechanism of its catalytic phosphorylation.

【Key words】 *Salmonella*; effector protein; culture crystals; protein kinase; SteC

沙门菌属(*Salmonella*)细菌是常见的革兰阴性肠源性致病菌,有2600多个血清型,其中鼠伤寒沙门菌是引起食源性疾病最常见的致病菌^[1-2]。研究发现,鼠伤寒沙门菌在入侵宿主细胞后通过蛋白分泌系统即Ⅲ型分泌系统(Type III secretion system, T3SS)将沙门菌致病岛(*Salmonella* pathogenicity island, SPI)所分泌的效应蛋白转运到宿主细胞内^[3],导致宿主细胞内的微管、微丝和肌动蛋白网络发生重大变化,并且在沙门菌的致病性与免疫逃逸中同样具有重要的意义^[4],因此,研究鼠伤寒沙门菌效应蛋白的功能有助于解释沙门菌与宿主细胞的相互作用机制。

鼠伤寒沙门菌效应蛋白 SteC(又称 STM1698)是沙门菌致病岛 2(SPI-2)分泌的由 457 个氨基酸组成的效应蛋白^[5],属于蛋白激酶超家族。多序列比对发现 SteC 与真核激酶 Raf-1 同源性为 28%,属于一种真核激酶蛋白而非原核激酶蛋白^[6],而且与具有激酶活性的细菌效应蛋白,如鼠疫耶尔森菌的 YpkA^[7]、福氏志贺菌的 OspG^[8-9]、黄单胞菌的 XopAU^[10] 比对中发现,SteC 是沙门菌效应蛋白中唯一一个具有激酶活性的蛋白^[11],体外生化试验证明第 256 位的赖氨酸是 SteC 激酶的酶活中心^[6]。此外,SteC 蛋白激酶活性受到双组分系统 SsrA-SsrB 的调控,SteC 被激活后诱导宿主细胞的肌动蛋白发生重排现象^[6]。除此之外,SteC 可激活 MEK、ERK、MLCK 及肌球蛋白 IIb 通路,导致宿主细胞发生肌动蛋白重排现象^[12]。磷酸化蛋白组学揭示引发效应蛋白 SteC 磷酸化发挥作用的体内外分子靶点是热休克蛋白 27(HSP27),当在 HeLa 细胞中过表达 SteC 时,HSP27 作为肌动蛋白聚合的调节剂促使多个位点被磷酸化并诱导肌动蛋白发生重排^[13]。而 SpvB 作为肌动蛋白-二磷酸腺苷(ADP)核糖基化毒素蛋白,其 N-末端结构域和 C-末端结构域之间含有一个多脯氨酸区域(氨基酸残基 366-374),这个结构域可将 N 端与 C 端肌动蛋白-ADP 核糖基化结构域分开,解聚因 SteC 磷酸化重排的肌动蛋白^[14-15]。由于 SteC 是沙门菌 T3SS 分泌的唯一一个具有激酶活性的效应蛋白,而且与已知激酶同源性较低,其催化蛋白磷酸化的机制尚不明确,因此解析 SteC 催化结构

域的空间结构对于阐明这种特殊激酶的催化机制具有重要意义。

利用生物信息学方法对鼠伤寒沙门菌效应蛋白 SteC 进行预测,其 C 端为催化结构域^[11],并且与以往发现的激酶同源性都较低,如何发挥激酶功能并不清楚。本研究在其 C 端催化结构域上截取 C1 及 C1_{C276S} 片段进行基因克隆,分别构建 SteC C1-pG101、SteC C1_{C276S}-pG101 两种重组菌株,在大肠埃希杆菌表达体系中使用 IPTG 诱导 SteC C1 及 SteC C1_{C276S} 蛋白的表达。使用亲和层析柱纯化获得高纯度的 SteC C1 及 SteC C1_{C276S} 蛋白,并进行晶体的培养,确定 SteC 蛋白晶体生长的条件并获得单晶性良好的晶体,为 SteC 蛋白质空间结构的解析以及进一步揭示其催化磷酸化的机制奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株及质粒 pET15b 改造的 pG101 载体(氨苄抗性,N 端 His 标签含 PPase 酶切位点)为本实验室保存。鼠伤寒沙门菌 14028s 菌株购于美国 ATCC 菌种库。

1.2 试剂和仪器 DNA 聚合酶,限制性核酸内切酶(BamHI、XhoI)及 T4 DNA 连接酶购自美国 Thermo 公司;DNA 胶回收试剂盒与质粒小提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;氨苄青霉素(Amp⁺)和异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自北京索莱宝科技有限公司;Ni²⁺ 亲和层析柱,AKTA 蛋白纯化仪及 Superdex 75 Increase 10/300 GL 凝胶过滤层析柱购自美国 Cytiva(思拓凡)公司;晶体普筛试剂盒及 Additive 试剂购自美国 Hampton 公司。

2 方法

2.1 SteC 蛋白的生物信息学预测 从 Uniprot 数据库获得 SteC 蛋白的氨基酸序列及分子质量,利用 Network Protein Sequence Analysis 与 PSIPRED Workbench 在线软件对其二级结构进行预测,利用 PyMol 软件(版本 2.5.0)对腾讯 AI Lab 预测的蛋白三级结构进行分析。结合其二级预测结构,选取截取片段,使用 ExPASy ProtParam tool 预测 SteC 蛋白基

本理化性质。

2.2 SteC C1 蛋白原核表达系统的构建和鉴定 使用 DNA start 软件设计 PCR 引物(表 1),引物由济南博尚公司合成。以鼠伤寒沙门菌 14028s 菌株为模板,使用表 1 中的引物 PCR 扩增 SteC 蛋白基因,经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定获得目的片段后切胶回收,回收产物与 pG101 载体分别使用限制性内切酶 BamH I 和 XhoI 于 37 °C 双酶切 3 h,酶切产物回收后经 T4 连接酶在 22 °C 连接 3 h,连接产物转入大肠埃希菌 BL21 感受态细胞(DE3),37 °C 复苏 1.5 h 后涂于固体平板(Amp⁺ 抗性),37 °C 恒温培养箱过夜。挑取固体平板上的单克隆菌落于 1 ml LB 液体培养基(Amp⁺ 抗性)中,37 °C 培养至 A₆₀₀ 值为 0.6 时加 IPTG,诱导表达 1.5 h。经 SDS-PAGE 电泳鉴定后获得阳性克隆菌株,送至济南博尚公司进行测序鉴定,测序正确的菌株命名为 SteC C1。

表 1 PCR 扩增引物
Table 1 Primers used in PCR amplification

引物名称 Segment	引物序列(5'-3') Sequences of primer	备注 Explanation
SteC-C1F- BamHI-5'	ATAGGATCCggcgctattgatca gacggat	下划线为 BamHI 酶切位点
SteC-C1 R-XhoI-3T	ATACTCGAGTTActgttgccgt gattcttctga	下划线为 XhoI 酶切位点

2.3 SteC C1_{C276S} 蛋白原核表达系统的构建及鉴定 利用两步 PCR 法将 SteC 第 276 位半胱氨酸突变为丝氨酸,突变蛋白原核表达系统的构建和鉴定与 SteC C1 蛋白原核表达系统一致,并命名为 SteC C1_{C276S}。

2.4 目的蛋白的大量表达 将测序正确的菌株培养过夜,第 2 d 转接于 1 L LB 培养基(Amp⁺ 抗性)中,37 °C、200 r/min 培养至 A₆₀₀ 值约为 0.6 时 18 °C 降温,1 h 后加入 IPTG 诱导过夜。

2.5 目的蛋白的纯化 参考文献[16]的蛋白纯化方法进行蛋白的提取。将镍柱纯化的蛋白使用凝胶层析柱进一步纯化,根据出峰位置对应收集管内的蛋白取样进行 SDS-PAGE 电泳鉴定,获得高纯度、高浓度的蛋白,分装于 1.5 ml EP 管内,液氮速冻后存于 -80 °C 冰箱。

2.6 目的蛋白的晶体培养 使用 GS PEG6000 及 Gird Screen A/S 试剂盒对蛋白浓度进行初筛,确定 5 mg/ml 的浓度适合 C1 及 C1_{C276S} 结构域晶体生长。选取 Hampton Research 的 Natrix II、Natrix、PEG/Ion II、Crystal Screen 等 12 个晶体生长试剂盒,在座滴板对晶体进行普筛,悬滴板进行晶体优化。使用 18 °C 晶体培养箱培养晶体,1 周、2 周后及 1 个月后观察晶体生长情况,并利用悬滴板进行晶体的优化,从而获得单晶性良好的晶体。

结果

1 SteC 蛋白生物信息学分析

沙门菌效应蛋白 SteC 是一种磷酸化激酶,是蛋白激酶家族的一员,第 256 位赖氨酸为其酶活中心^[6],但结构未知且数据库中无同源结构。

1.1 SteC 蛋白理化性质及其结构预测分析

PrptParam 在线软件分析显示,SteC 蛋白由 457 个氨基酸组成,相对分子质量为 52.3×10^3 ,等电点(pI)为 5.2,不稳定系数为 48.74(>40 为不稳定),因此该蛋白性质不稳定。其 N 端含有 6 个半胱氨酸,可能在蛋白折叠的过程中发生错误折叠而降低其表达量,导致可溶性变差。此效应蛋白无保守结构,不存在跨膜结构。使用 NSP@:Network Protein Sequence Analysis 与 PSIPRED Workbench 在线软件对其二级结构进行预测,该蛋白二级结构含有 44.42% 的无规卷曲(Cc)、40.26% 的 α 螺旋(Hh)及 15.32% 的 β 螺旋(Ee),而且氨基酸序列的 63-88、164-176、191-205 位氨基酸区段存在较长的无规则卷曲(图 1),不利于晶体的生长。



图 1 SteC 蛋白二级结构预测
Fig. 1 Prediction of two structure of SteC protein

SteC 的 N 端为与 CadC24 结合的结构域,C 端为含有激酶结构域的催化结构域^[11](图 2),而结合预测的二级结构发现 C 端结合结构域尾部依旧有 3 处较

短的无规则卷曲,从而选择将其 202-375 位氨基酸截取为一个催化结构域进行研究,将其命名为 SteC C1,用于 SteC 蛋白晶体的培养。

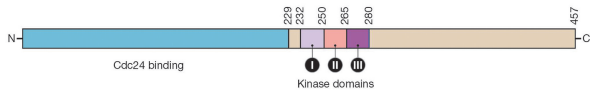


图 2 SteC 结合 Cdc24 和激酶结构域的示意图^[10]
Fig. 2 Schematic of SteC showing the region binding Cdc24 and kinase domains

1.2 SteC C1 蛋白理化性质及其结构预测分析 使用 1.1 的方法对 SteC C1 片段进行相关预测,结果表明 SteC C1 是一个大小为 19.7×10^3 片段,共 174 个氨基酸且只含有一个半胱氨酸(Cys),其氨基酸组成见表 2,带负电残基总数(Asp+Glu)为 27,带正电残基总数(Arg+Lys)为 21,理论 pI 为 5.23。其三级结构预测见图 3。三级预测结构分析发现 C1 片段由 7 个 α 螺旋、8 个 β 折叠及无规则卷曲组成,其无规则卷曲比例为 48.28%, α 折叠与 β 螺旋所占比例分别为 25.29%、26.44%。

表 2 SteC C1 蛋白氨基酸组成
Table 2 The amino acids composition of SteC C1 protein

氨基酸 Amino acid	数量 Number	频率(%) Frequencies	氨基酸 Amino acid	数量 Number	频率(%) Frequencies
丙氨酸 Ala	9	5.2	亮氨酸 Leu	9	5.2
精氨酸 Arg	10	5.7	赖氨酸 Lys	11	6.3
天冬酰胺 Asn	14	8	甲硫氨酸 Met	5	2.9
天冬氨酸 Asp	16	9.2	苯丙氨酸 Phe	7	4
半胱氨酸 Cys	1	0.6	脯氨酸 Pro	5	2.9
谷氨酰胺 Gln	9	5.2	丝氨酸 Ser	12	6.9
谷氨酸 Glu	11	6.3	苏氨酸 Thr	3	1.7
甘氨酸 Gly	11	6.3	酪氨酸 Tyr	6	3.4
组氨酸 His	4	2.3	缬氨酸 Val	16	9.2
异亮氨酸 Ile	15	8.6	色氨酸 Try	0	0

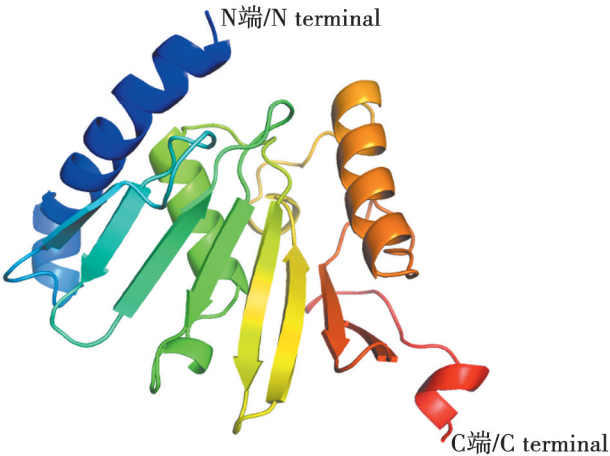
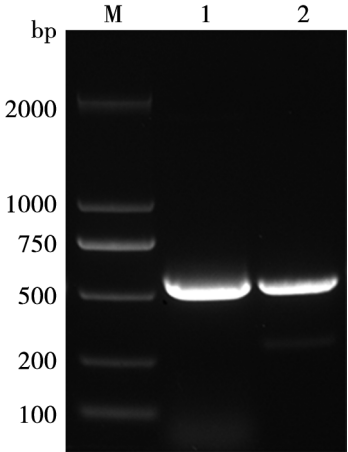


图 3 SteC C1 蛋白三级结构预测
Fig. 3 Prediction of tertiary structure of SteC C1 protein

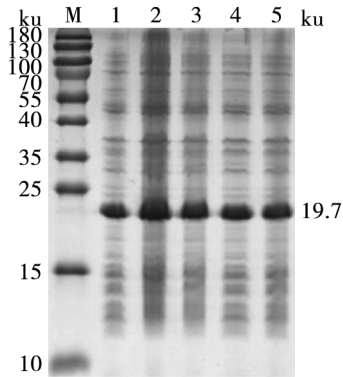
2 SteC C1 与 SteC C1_{C276S} 蛋白原核表达系统的构建及鉴定

鼠伤寒沙门菌效应蛋白 SteC C1 片段 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,大小为 522bp(图 4),与预期结果一致。阳性重组菌株经 IPTG 诱导表达后通过 SDS-PAGE 电泳鉴定获得相对分子质量为 19.7×10^3 的阳性重组菌落。对 2 号、4 号菌株进行测序,测序正确后命名为 SteC C1 和 SteC C1_{C276S}(图 5)。



M DNA 标志物 1 SteC C1 PCR 产物 2 SteC C1_{C276S} PCR 产物
图 4 SteC C1 及 SteC C1_{C276S} 基因 PCR 产物 1%琼脂糖凝胶电泳分析

M DNA marker 1 SteC C1 PCR product 2 SteC C1_{C276S} PCR product
Fig. 4 PCR amplification result of SteC C1 gene and SteC C1_{C276S} gene



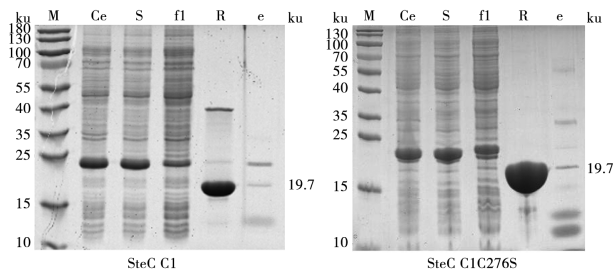
M 蛋白分子质量标准 1、2、3 SteC C1 重组菌株克隆 4、5 SteC C1_{C276S} 重组菌株克隆

图 5 不同单克隆菌株表达目的蛋白 test 分析
M Protein molecular 1、2、3 For SteC C1 recombinant strain clone 4、5 For SteC C1_{C276S} recombinant strain clone
Fig. 5 Different monoclonal strains express the protein of test results

3 SteC C1 及 SteC C1_{C276S} 蛋白的纯化

将阳性重组菌株扩大培养,低温诱导蛋白表达,使用 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化后进行 SDS-PAGE 电泳鉴定分析(图 6)。PP 酶酶切后的蛋白进行凝胶层析柱的纯化,根据蛋白洗脱出峰位置(图 7、图 8)取样进行 SDS-PAGE 电泳鉴定分析(图 9、图 10),获得浓度为

12mg/ml 的蛋白。分析 Ni^{2+} 及凝胶层析柱洗脱液 SDS-PAGE 胶图, SteC C1 既有二聚体又有单体的形式, 可能是蛋白序列中的半胱氨酸引起。将片段中仅有的一个半胱氨酸突变为丝氨酸后, 分析 SDS-PAGE 胶图, SteC C1_{C276S} 仅以单体形式存在, 说明 SteC C1 二聚体的形成是由半胱氨酸导致的。



M 蛋白分子质量标准 Ce 重组菌超声破碎全菌蛋白 S 重组菌超声破碎上清 Fl 镍柱流穿液 R 无组氨酸标签蛋白洗脱液 e 镍柱总蛋白洗脱液

图 6 Ni^{2+} 亲和层析纯化的 SteC C1 及 SteC C1_{C276S} SDS-PAGE 电泳分析

M Protein marker Ce Crude extraction S Protein of crushed supernatant Fl Flow through R No histidine tag protein e Elution

Fig. 6 SDS-PAGE analysis results of SteC C1 and SteC C1_{C276S} proteins on Ni^{2+} affinity chromatography column

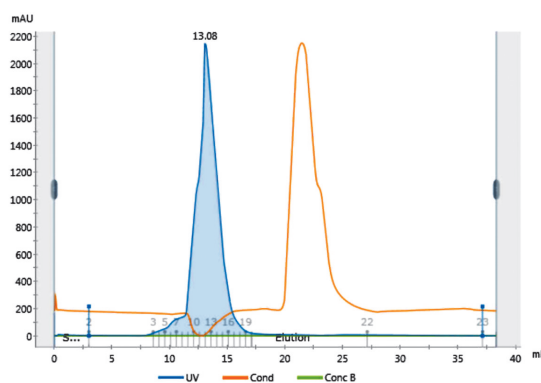


图 7 SteC C1 蛋白的凝胶层析纯化洗脱图
Fig. 7 The purification result of SteC C1 protein by Superdex 75 increase 10/300GL

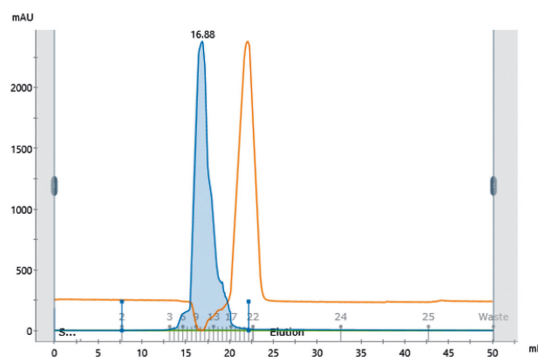
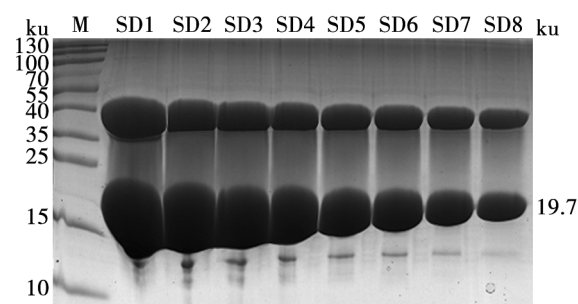


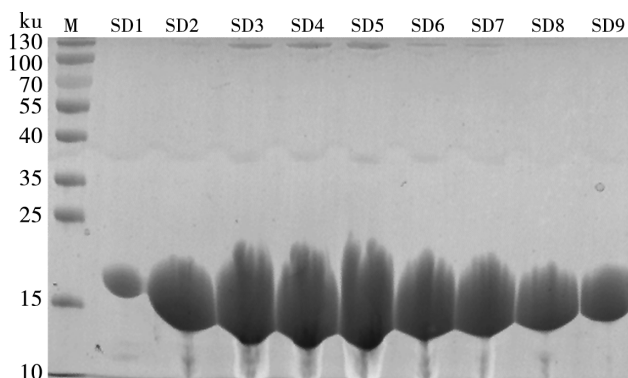
图 8 SteC C1_{C276S} 蛋白的凝胶层析纯化洗脱图
Fig. 8 The purification result of SteC C1_{C276S} protein by Superdex 75 increase 10/300GL



M 蛋白分子质量标准 SD1-SD8 9-16 管洗脱液

图 9 SteC C1 蛋白的凝胶层析柱洗脱液 SDS-PAGE 电泳分析

M Protein marker SD1-SD8 SteC protein eluent from 9-16 tubes
Fig. 9 SDS-PAGE analysis result of STEC C1 protein by Superdex 75 Increase 10/300GL



M 蛋白分子质量标准 SD1-SD8 8-16 管洗脱液

图 10 SteC C1_{C276S} 蛋白的凝胶层析柱洗脱液 SDS-PAGE 电泳分析

M Protein marker SD1-SD9 SteC C1_{C276S} protein eluent from 8-16 tubes

Fig. 10 SDS-PAGE analysis result of SteC C1_{C276S} protein by Superdex 75 Increase 10/300GL

4 晶体普筛及优化

SteC 是沙门菌 T3SS 分泌的一种激酶, 但其催化磷酸化的机制尚不清楚。为了揭示这一机制, 本研究在晶体培养过程中添加了 ATP 类似物及金属离子 Mg^{2+} 来促进蛋白晶体结晶。由于蛋白浓度较高, 首先使用 Hampton Research 公司的 GS PEG6000 及 Gird Screen A/S 试剂盒寻找适合晶体生长的蛋白浓度。蛋白浓度在 5 mg/ml 时, 沉淀率约 30%~40%, 表明此浓度适合晶体生长。随后使用 Hampton Research 试剂盒对 SteC C1 及 SteC C1_{C276S} 蛋白进行普筛, 2 个月后于 2 mol/L ammonium sulfate、0.05 mol/L Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5、0.01 mol/L Magnesium sulfate heptahydrate 条件下分别获得了 SteC C1、SteC C1_{C276S} 结合 ATP 类似物与 Mg^{2+} 的晶体及 SteC C1、SteC C1_{C276S} 的蛋白晶体, 但晶体单晶性较差。为了获得单晶性良好的晶体, 利用 Hampton Research 公司的 additive 试剂盒在此条件下对晶体进一步培养, 发现在含有 0.1 mol/L 碘化钠添加剂的情

况下更容易获得晶型良好的蛋白晶体。使用悬滴板进行多次晶体优化,获得晶型良好的晶体(图 11)。

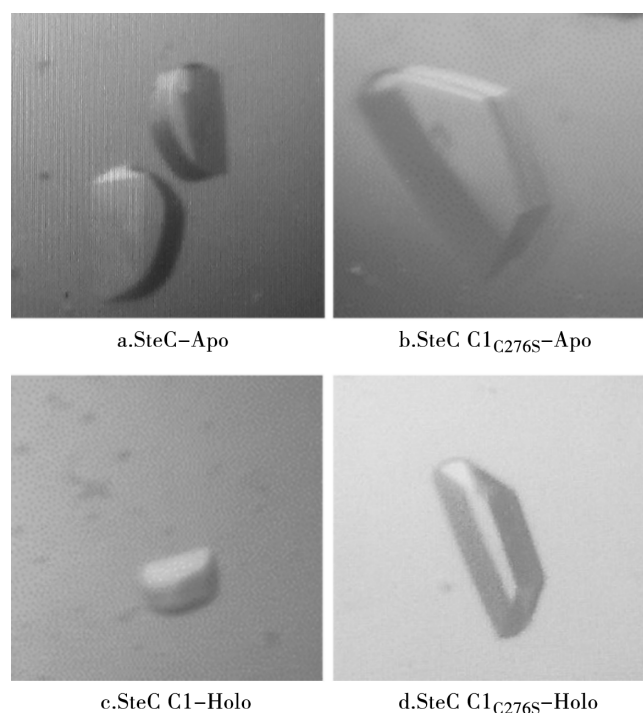


图 11 SteC C1(a,c)与 SteC C1_{C276S}(b,d)蛋白晶体图
Fig. 11 Crystals of SteC C1(a,c) and SteC C1_{C276S}(b,d)

讨 论

鼠伤寒沙门菌感染引发的疾病具有地方性及发病率高的特点,难以实施具体的措施加以管控,而被称为公共卫生背景下的一种重要的人畜共患病原菌^[17]。鼠伤寒沙门菌利用 T3SS 系统所分泌的多种毒力蛋白(效应蛋白)来改变宿主细胞生理学并利于自身在宿主组织中的存活,通过效应器间的协同作用及其分泌的效应蛋白与宿主细胞相互作用,从而破坏宿主细胞的细胞骨架、信号转导途径、膜运输和促炎反应,这使得鼠伤寒沙门菌能够侵入非吞噬性上皮细胞,并在细胞内复制、繁殖,导致全身性疾病^[18]。

SteC 是鼠伤寒沙门菌 T3SS 分泌的唯一一种具有激酶功能的效应蛋白,在感染过程中可导致宿主细胞骨架发生重排。研究发现,Rho GTPase 是参与细胞骨架肌动蛋白重排的重要调节因子^[19],而沙门菌在感染过程中导致宿主细胞骨架发生重排的主要原因是其分泌的效应蛋白通过调节 Rho GTPase 活性所引发的^[20]。SteC 激酶 N 端非激酶结构域与 Cdc24 的催化结构域相互作用可以改变 Cdc24 因子在细胞内的定位,从而调控 Cdc42 因子来抑制 GTPase 的信号传导,阻止核聚集^[21],但目前对于 SteC 如何调控宿主细胞导致肌动蛋白重排的机制仍不明确。相比较于其他细菌中具有激酶活性的效应蛋白 YpkA^[7]、OspG^[8-9]以及 XopAU^[10],SteC 尽管已经被证实是沙门菌中唯一

具有激酶活性的蛋白,但其催化机制目前尚不清楚。而本研究通过培养 SteC C1-Holo、SteC C1_{C276S}-Holo 和 SteC C1-Apo、SteC C1_{C276S}-Apo4 种晶体,为揭示 SteC 作为激酶发挥磷酸化作用的机制奠定了基础。但 SteC 与其他激酶同源性较低(<30%),无法使用分子置换进行结构解析。而常用的解决蛋白晶体衍射相位的方法是硒原子多波长反常散射法^[22],主要是因为硒代甲硫氨酸能够在不影响蛋白质性质的情况下完全替代甲硫氨酸^[23]从而解决相位问题。因此可通过 Se-MAD 解析相位获得 SteC 的空间结构。

本研究通过生物信息学分析及已有研究^[11]认为 SteC 的 C 端结构域具有催化功能,通过基因克隆技术分别构建 SteC C1、SteC C1_{C276S} 两种重组菌株,在大肠埃希菌表达体系中进行表达纯化,成功获得纯度均一的蛋白,用于晶体的普筛及多次优化,获得晶型良好的晶体,为揭示 SteC 作为激酶在体内发生磷酸化及其与底物相互作用机制奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Alghoribi MF, Doumith M, Alrodayyan M, et al. *S. enteritidis* and *S. typhimurium* harboring SPI-1 and SPI-2 Are the predominant serotypes associated with human salmonellosis in Saudi Arabia [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019(9):187.
- [2] Gogoi M, Shreenivas MM, Chakravortty D. Hoodwinking the big-eater to prosper: the Salmonella-macrophage paradigm [J]. J Innate Immun, 2019(11):289-299.
- [3] Diepold A, Armitage JP. Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2015, 370(1679):20150020.
- [4] 王超, 康喜龙, 顾丹, 等. 沙门菌Ⅲ型分泌系统主要效应蛋白功能的研究进展 [J]. 中国家禽, 2020, 42(6):83-88.
- [5] Hensel M, Hinsley AP, Nikolaus T, et al. The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium* [J]. Mol Microbiol, 1999(32):275-287.
- [6] Poh J, Odendall C, Spanos A, et al. SteC is a Salmonella kinase required for SPI-2-dependent F-actin remodelling [J]. Cell Microbiol, 2008, 10(1):20-30.
- [7] Galyov EE, Hakansson S, Forsberg A, et al. A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant [J]. Nature, 1993(361):730-732.
- [8] Kim DW, Lenzen G, Page AL, et al. The *Shigella flexneri* effector OspG interferes with innate immune responses by targeting ubiquitin-conjugating enzymes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005(102):14046-14051.
- [9] Pruneda JN, Smith FD, Daurie A, et al. E2-Ub conjugates regulate the kinase activity of *Shigella* effector OspG during pathogenesis [J]. EMBO J, 2014(33):437-449.
- [10] Teper D, Girija AM, Bosis E, et al. The *Xanthomonas euvesicatoria* type III effector XopAU is an active protein kinase that manipulates plant MAP kinase signaling [J]. PLoS Pathog, 2018(14):e1006880.

(下转 286 页)

- 血吸虫病防治杂志, 2013, 25(2): 202.
- [4] Andrews KT, Fisher G, Skinner-Adams TS. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases[J]. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2014 24;4(2):95-111.
- [5] 赵娜, 张西臣. 硝唑尼特临床应用研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(02): 146-148+152.
- [6] 董靖, 邓旭明, 邓彦宏. 抗寄生虫新药硝唑尼特研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(5): 51-53.
- [7] 何茜, 胡文君, 李行舟. 硝唑尼特药理作用及临床应用的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32(4): 10.
- [8] Galvan-Ramirez Mde L, Dueñas Jimenez JM, Rocio Rodriguez Perez L, et al. Effect of nitazoxanide and pyrimethamine on astrocytes infected by *Toxoplasma gondii* in vitro [J]. Arch Med Res. 2013, 44(6): 415-421.
- [9] El-Kowrany SI, El Ghaffar AEA, Shoheib ZS, Mady RF, Gamea GAM. Evaluation of nitazoxanide as a novel drug for the treatment of acute and chronic toxoplasmosis[J]. Acta Trop. 2019, 195: 145-154.
- [10] Allam A, Shehab A Y, Mogahed N, et al. Effect of nitazoxanide and spiramycin metronidazole combination in acute experimental toxoplasmosis[J]. Heliyon, 2020, 16; 6(4): e03661.
- [11] 朱祥明. SYBR-Green1 荧光定量 PCR 检测弓形虫 B1 基因实验方法的建立及应用[D]. 昆明: 昆明医学院, 2006.
- [12] Murphy JR, Friedmann JC. Pre-clinical toxicology of nitazoxanide - a new antiparasitic compound[J]. J Appl Toxicol. 1985, 5(2): 49-52.
- [13] 郭珊珊. 弓形虫 rTgPRF 蛋白疫苗的制备及其保护性研究[D]. 遵义医科大学, 2020.
- [14] Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*-the first 100 years [J]. J Eukaryot Microbiol, 2008, 55(6): 467 - 475.
- [15] Suzuki Y, Orellana M, Schreiber R, et al. Interferon-gamma; the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii* [J]. Science, 1988, 240(4851): 516-518.
- [16] 王世若, 王兴龙, 韩文瑜. 现代动物免疫学[M]. 吉林科学技术出版社, 1996.
- [17] Noda M, Inaba Y, Banjo M, et al. Isolation of Fukuoka virus, a member of the Kern Canyon serogroup viruses of the family Rhabdoviridae, from cattle[J]. Vet Microbiol. 1992, 32(-4): 267-271.
- [18] 蒲元华, 张德林. 弓形虫入侵宿主机制及免疫学研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30(6): 7.
- [19] Afifi MA, Al-Rabia MW. The immunomodulatory effects of rolipram abolish drug-resistant latent phase of *Toxoplasma gondii* Infection in a murine model[J]. J Microsc Ultrastruct, 2015, 3(2): 86-91.
- [20] 吴升伟, 胡国顺, 王正蓉, 等. 隐性弓形虫感染小鼠诱发急性弓形虫病模型的研究[J]. 动物医学进展, 2013, 34(10): 4.
- 【收稿日期】 2022-11-11 【修回日期】 2023-01-15

(上接 281 页)

- [11] Heggie A, Cerny O, Holden DW. SteC and the intracellular *Salmonella*-induced F-actin meshwork[J]. Cell Microbiol, 2021 (23): e13315.
- [12] Odendall C, Rolhion N, Frster A, et al. The *Salmonella* kinase SteC targets the MAP kinase MEK to regulate the host actin cytoskeleton[J]. Cell Host Microbe, 2012(12): 657-668.
- [13] Imami K, Bhavsar A P, YH, et al. Global impact of *Salmonella* pathogenicity island 2-secreted effectors on the host phosphoproteome[J]. Mol Cell Proteomics, 2013 (12): 1632-1643.
- [14] Hochmann H, Pust S, von Figura G, et al. *Salmonella enterica* SpvB ADP-ribosylates actin at position arginine-177- characterization of the catalytic domain within the SpvB protein and a comparison to binary clostridial actin-ADP-ribosylating toxins[J]. Biochemistry, 2006; 45(4): 1271-1277.
- [15] Jennings E, Thurston TLM, Holden DW. *Salmonella* SPI-2 Type III secretion system effectors: Molecular mechanisms and physiological consequences[J]. Cell Host Microbe, 2017, 22: 217-231.
- [16] 杨银龙, 岳盈盈, 宋楠楠, 等. 鼠伤寒沙门菌 AvrA 蛋白的原核表达及纯化[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(12): 1305-1309.
- [17] Majowicz SE, Musto J, Scallan E, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella gastroenteritis* [J]. Clin Infect Dis, 2010(50): 882-889.
- [18] McGhie EJ, Brawn LC, Hume PJ, et al. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host[J]. Curr Opin Microbiol, 2009(12): 117-124.
- [19] Brakebusch C. Rho GTPase Signaling in Health and Disease: A Complex Signaling Network[J]. Cells, 2021, 10: undefined.
- [20] Zhou D, Chen LM, Hernandez L, et al. A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization[J]. Mol Microbiol, 2001 (39): 248-259.
- [21] Fernandez-Pinar P, Aleman A, Sondek J, et al. The *Salmonella typhimurium* effector SteC inhibits Cdc42-mediated signaling through binding to the exchange factor Cdc24 in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Mol Biol Cell, 2012(23): 4430-4443.
- [22] 徐春艳, 郁峰, 孙丽华, 等. 多波长反常散射法解析 Sau3AI 蛋白 C 端结构域晶体结构[J]. 核技术, 2008(11): 801-805.
- [23] Sarikaya BO, Bayram O, Valerius O, et al. LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity[J]. PLoS Genet, 2010(6): e1001226.
- 【收稿日期】 2022-11-18 【修回日期】 2023-01-22