

网络出版时间: 2016-6-22 14:44:57 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160622.1444.002.html>

◇基础医学研究◇

肠出血性大肠杆菌效应因子 z2151 的 E3 泛素连接酶活性鉴定

陈芳红^{1,2} 李涛² 李 颖² 孙超尘² 王 慧^{1,2}

摘要 目的 利用基因工程方法原核表达 z2151 蛋白,并鉴定其 E3 泛素连接酶活性。方法 以肠出血性大肠杆菌 O157:H7 为模板,PCR 扩增目的基因,构建重组表达载体 pET22b-z2151,转化 BL21(DE3),诱导蛋白表达,采用镍柱亲和纯化获取目的蛋白;通过体外泛素化实验检测蛋白泛素连接酶活性。结果 亲和纯化得到较高浓度和纯度的 z2151 蛋白,其在体外泛素化反应中能够促使泛素小分子形成多聚泛素链,即有 E3 泛素连接酶活性;而且对 E2 泛素结合酶具有一定的选择特异性。结论 原核表达质粒 pET22b-z2151 构建成功,目的蛋白 z2151 具有泛素连接酶的体外泛素化能力,并且针对不同的 E2 酶亲和力不同,这些都为后续功能机制研究奠定了基础。

关键词 基因工程;肠出血性大肠杆菌 O157:H7;泛素连接酶;体外泛素化

中图分类号 R 378.21;Q 78

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)08-1077-04

肠出血性大肠杆菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) O157:H7 是人和动物重要的肠道致病菌^[1],可通过污染水源、食物等感染宿主导致腹泻、出血性结肠炎等,带来严重的临床危害^[2],严重者可导致死亡^[3]。2006 年 PNAS 上报道过一些 EHEC 效应因子,其中 z2151 属于效应分子之一,存在于细菌前噬菌体上,属于非毒力岛编码的效应因子,是一种含有类似 Ring 结构域(环指结构)的 E3 泛素连接酶。E3 泛素连接酶发现较晚,数量庞大且功能复杂,是近年来研究的热点,E3 泛素连接酶是泛素化途径中决定底物特异性的关键酶,参与细胞周期、信号转导、炎症反应等的介导调控^[4]。

此外,在底物靶蛋白未知的情况下,E3 酶可以调控泛素分子之间形成多聚泛素链或者将泛素链连接在自身蛋白上^[5]。该研究利用大肠杆菌表达系统,表达并纯化得到 His-z2151 蛋白;后续活性检测显示其具有泛素连接酶的体外泛素化能力,初步探究了 z2151 分子的泛素化作用,为后续其他功能机制研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 菌株 EDL933、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、大肠杆菌 BL21(DE3) 表达感受态细胞、pEASY-T1 simple 载体均购自北京全式金生物技术有限公司;pET22b 载体为实验室保存。

1.1.2 主要试剂及仪器 高保真 TransStart Taq DNA 聚合酶、DNA Marker 及蛋白 Marker 购自北京全式金生物技术有限公司;基因组提取试剂盒购自美国 Promega(北京)公司;PCR 产物纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京博迈德科技发展有限公司;限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶购自美国 New England Biolab 公司;LB 培养基(干粉)购自英国 OXOID 公司;氨苄西林(Amp)、IPTG 购自德国 Sigma 公司;HisTrap FF crude 5 ml 预装柱、半干膜电转仪购自美国 GE(北京)公司;E1 酶(UBE1)、E2 酶(UBE2D2、UBE2E3)、抗泛素抗体(anti-Ub)、泛素(Ub)购自美国 Boston Biochem 公司;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;琼脂糖凝胶电泳仪购自北京六一仪器厂;超声波细胞粉碎机购自宁波新芝生物科技股份有限公司;蛋白电泳仪及凝胶成像分析仪 ChemiDocTMXRS 购自美国 BIO-RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 PCR 引物由中美泰和生物技术有限公司合成,用于扩增 z2151 基因,其中 z2151 上游引物:5'-CATATGATGCCTGTAGATTTAACG-3'(下

2016-05-04 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81401643)

作者单位:¹安徽医科大学军事医学科学院微生物流行病学研究所,合肥 230032

²军事医学科学院微生物流行病学研究所病原微生物生物安全国家重点实验室,北京 100071

作者简介:陈芳红,女,硕士研究生;

王 慧,女,研究员,博士生导师,责任作者,E-mail: Geno0109@vip.sina.com

划线标注限制性内切酶酶切位点 Nde I), 下游引物: 5'-CTCGAGATTTTTTAAACGAAGTTAC-3' (下划线标注限制性内切酶酶切位点 Xho I)。

1.2.2 目的基因 z2151 的克隆 LB 培养基过夜培养 EHEC O157 : H7, 次日提取基因组。然后以 EHEC O157 : H7 基因组为模板 PCR 扩增 z2151 基因, 序列大小为 642 bp, PCR 扩增条件: 95 °C、10 min 94 °C、30 s 55 °C、30 s 72 °C、40 s 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。纯化回收 PCR 产物, 与克隆载体 pEASY-T1 simple 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞进行克隆。次日挑取克隆, 引物 z2151F、z2151R 进行 PCR 鉴定, 将阳性克隆提取重组质粒。

1.2.3 重组表达载体的构建 Nde I、Xho I 双酶切 pEASY-z2151 和空载体 pET22b, 并回收目的片段和载体, 两者 16 °C 连接过夜。取 5 μ l 连接产物加入到 100 μ l 刚解冻的感受态细胞中 (DH5 α), 冰浴 30 min 42 °C 热激 45 s, 冰上 2 min, 加入 500 μ l 常温的 LB 培养基, 37 °C 摇菌 1 h, 取 100 μ l 菌液涂匀涂于含氨苄的 LB 平板, 37 °C 倒置培养过夜。次日挑取克隆, 引物 z2151F、z2151R 进行 PCR 鉴定, 将阳性克隆提取重组质粒, 测序正确后转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达感受态细胞, SDS-PAGE 鉴定表达。

1.2.4 目的蛋白的诱导表达及纯化 阳性单克隆培养过夜, 次日转接至 1 L LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养至菌液光密度 (optical density, OD) 值 0.6, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 20 °C、110 r/min 诱导表达 20 h。用缓冲液 A (20 mmol/L 磷酸钠、500 mmol/L 氯化钠、40 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 冲洗菌体, 收集菌体并超声破碎, 获取细菌蛋白, 5 000 r/min、4 °C 离心取上清液, 预装柱纯化目的蛋白步骤如下, 取 100 ml 蒸馏水洗预装柱, 小心注射, 防止带进气泡; 用 100 ml 缓冲液 A 平衡柱子, 蛋白混合液上清缓慢注入预装柱; 再用 100 ml A 液平衡预装柱; 最后用洗脱液 B (20 mmol/L 磷酸钠、500 mmol/L 氯化钠、400 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 洗脱收集目的蛋白, 每管 5 ml, 收集 6 管; 再用 B 液 80 ml 洗预装柱, 除去残余蛋白后保存于 20% 酒精。SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定目的蛋白, 透析蛋白, 缓冲液 (0.5 mmol/L TCEP、300 mmol/L NaCl、10 mmol/L HEPES, pH 7.5) 透析保存, 并检测蛋白纯度和浓度。

1.2.5 目的蛋白 z2151 泛素连接酶活性的鉴定 20 μ g 反应体系: 2 μ g His6-z2151 蛋白, 0.13 μ g E1 酶, 2 μ g E2 酶 (UBE2D2、UBE2E3), 4 μ g 泛素蛋白,

反应缓冲液 [50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L ATP, 10 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L DTT], 37 °C 水浴孵育 1 h, 4 \times SDS-PAGE loading buffer 终止反应。将反应混合物和预染 Marker 进行 SDS-PAGE 电泳, 初始电压 110 V、20 min, 然后调换电压至 180 V、60 min 进行分离。将 PVDF 膜用甲醇浸湿 30 s, 将分离胶、PVDF 膜及滤纸同时浸泡在电转缓冲液中 30 min。使 PVDF 膜位于正极, 胶位于负极, 65 mA 电转 1.5 h, 使蛋白从胶上转移至 PVDF 膜上。将电转后的 PVDF 膜浸泡于脱脂奶粉中, 室温封闭 2 h 后 PBST 溶液洗膜 3 次, 每次 10 min。将 PVDF 膜置于密封袋, 加入稀释好的一抗溶液 (anti-Ub) 4 °C 放置过夜。洗膜 5 次, 加入稀释好的二抗, 室温震荡 40 min, PBST 溶液充分洗涤后进行曝光检测。

2 结果

2.1 目的基因 z2151 的扩增 高保真 Taq 酶 PCR 扩增 z2151 基因, 大小 642 bp, 测序鉴定正确, 与 Genbank 公布序列一致, 琼脂糖胶回收并纯化 PCR 产物, 连接克隆载体 pEASY-T1 simple 进行片段扩增, 用于后续酶切。见图 1。

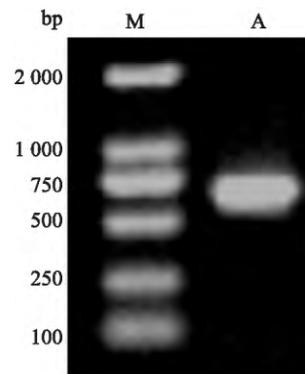


图 1 PCR 扩增 z2151 基因

M: 2 000 bp DNA Marker; A: z2151 基因片段

2.2 重组克隆的筛选与鉴定 双酶切基因片段和 pET22b 载体, T4 连接酶连接后转化 DH5 α 感受态细胞, 次日挑选氨苄 LB 平板上的单克隆, 以引物 z2151F、z2151R 鉴定重组菌, 片段大小为 642 bp, 证明表达载体构建成功。见图 2。重组质粒 pET22b-z2151 转化 BL21 (DE3) 感受态细胞用于蛋白的表达。

2.3 目的蛋白的诱导表达及鉴定 添加 IPTG 诱导含有重组质粒的 BL21 (DE3) 表达菌, 以 5 000 r/min、

4 °C 离心 30 min 获取菌体沉淀,裂解变性后 SDS-PAGE 鉴定有明显蛋白表达,蛋白大小为 24 ku,与预测理论值相同,诱导蛋白表达成功。见图 3。

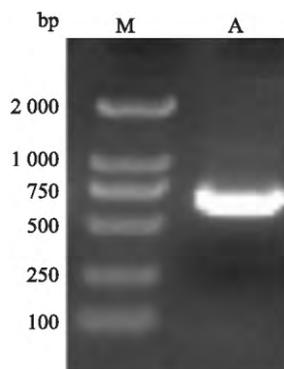


图 2 PCR 鉴定 z2151 基因

M: 2 000 bp DNA Marker; A: PCR 扩增的目的基因片段

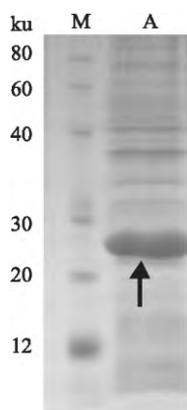


图 3 目的蛋白 z2151 的表达鉴定

M: Marker; A: 全菌表达鉴定(箭头所示)

2.4 目的蛋白的亲纯化 大批发酵的菌体蛋白经超声破碎后,8 000 r/min、4 °C 离心 30 min 取上清液,利用蛋白带有组氨酸标签这一特性,采用镍柱亲和纯化,洗脱后,对先后洗脱的蛋白液分别进行 SDS-PAGE 分离鉴定,可见目的蛋白(箭头所示)从第 2 管开始被洗脱出柱,至第 4 管仍有大量蛋白出现,杂蛋白较少,纯度达到 95%,Bradford 定量,蛋白浓度高达 0.8 mg/ml。见图 4。

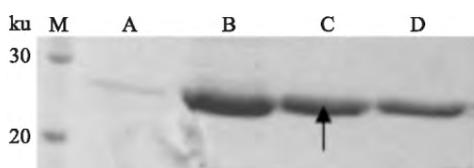


图 4 z2151 蛋白纯化电泳图

M: Marker; A ~ D: 纯化的 z2151 蛋白(箭头所示)

2.5 目的蛋白的泛素连接酶活性鉴定 在底物靶蛋白未知的情况下,E3 泛素连接酶可以自身进行泛素化,抗泛素抗体检测反应复合物会呈现大小不同的蛋白条带。体外泛素化反应体系: E1 (UBE1), E2: UBE2D2、UBE2E3,泛素(Ub), z2151 蛋白,抗泛素抗体(anti-Ub) 检测。蛋白呈现梯形分布,泛素链大小是由泛素分子数量决定的,针对不同的 E2 酶(UBE2D2、UBE2E3),泛素链形成的大小与数量都有差异,z2151 泛素连接酶与 UBE2D2 亲和力更高,活性更大。分布在 35 ~ 100 ku 甚至更大的条带均为泛素链蛋白。见图 5。

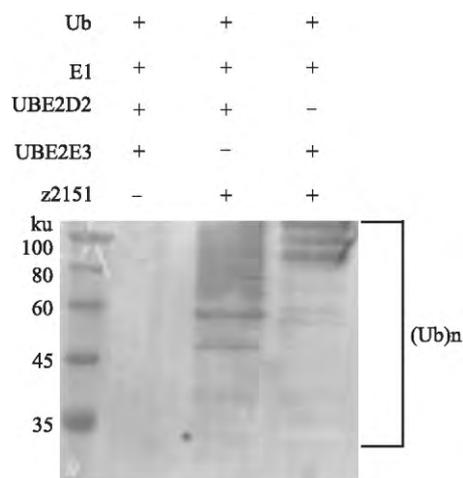


图 5 z2151 蛋白的自身泛素化

3 讨论

泛素化作为一种蛋白的翻译后修饰,调控众多生物进程,启动细胞快速应答周围环境的改变^[6]。泛素化最初是在真核细胞中发现的^[7],泛素化是一个包括 E1(泛素激活酶)、E2(泛素结合酶)、E3(泛素连接酶)蛋白的多酶级联反应^[8]。其中,泛素连接酶 E3 在调节生物过程中起着关键作用,很多疾病的发生都与其异常表达有关。真核生物中已发现近千种 E3 酶,数量庞大,而且功能复杂各异。然而在细菌中是缺乏这样典型的泛素化系统的,即缺失所有或者部分关键酶,没有完整泛素化必备元件,必须借助外界条件进行泛素修饰。研究^[9-10]表明许多细菌病原体利用一些毒力因子破坏并开发宿主泛素化系统,有效触发宿主泛素化系统,使病原菌逃避宿主免疫系统攻击。已有许多证据显示一些病原菌编码分泌的效应因子具有 E3 泛素连接酶活性。这些 E3 酶效应物运输进入宿主体内,挟持宿主泛素

化途径,使得细菌颠覆宿主防御系统,篡夺宿主细胞功能,操纵宿主信号系统来利于自身生存。如在 EHEC 中发现了有 E3 连接酶活性的 NleL 效应分子^[11],其作为一种 E3 泛素连接酶,在 EHEC 的定植和侵染扩散细胞过程中扮演重要角色。

EHEC 是一种食源性致病菌,也是人和动物重要的肠道致病菌,可引起严重腹泻,其感染还会带来严重的临床危害。在 EHEC 的效应分子中发现了 z2151 分子,为了证实 z2151 分子 E3 泛素化连接酶活性及后续的功能机制,是否参与细菌的感染与治病等。本研究成功获得 z2151 的可溶性原核表达,并且体外泛素化实验显示,重组 z2151 具有 E3 泛素连接酶活性,并且针对不同的 E2 酶选择性不同。这为后续深入研究酶的功能机制及可能的底物关系奠定良好的基础。并且有助于丰富细菌调控宿主免疫系统的理论研究。

参考文献

- [1] Piscatelli H, Kotkar S A, McBee M E, et al. The EHEC type III effector NleL is an E3 ubiquitin ligase that modulates pedestal formation [J]. *PLoS One* 2011 6(4): e19331.
- [2] Pacheco A R, Sperandio V. Shiga toxin in enterohemorrhagic *E. coli*: regulation and novel anti-virulence strategies [J]. *Front Cell In-*

- fect Microbiol 2012 2: 81.
- [3] Tyler J S, Beerl K, Reynolds J L, et al. Prophage induction is enhanced and required for renal disease and lethality in an EHEC mouse model [J]. *PLoS Pathog*, 2013 9(3): e1003236.
- [4] Ashida H, Kim M, Sasakawa C. Exploitation of the host ubiquitin system by human bacterial pathogens [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2014 12(6): 399-413.
- [5] 李杨,李栋. 泛素连接酶-底物选择关系的研究进展 [J]. *生物技术通报* 2015 31(1): 11-20.
- [6] 卢亮,李栋,贺福初. 蛋白质泛素化修饰的生物信息学研究进展 [J]. *遗传* 2013 35(1): 17-26.
- [7] 马苗苗,李伟,井勇,等. 牛孤雌胚胎发育过程中泛素定位与线粒体分布的相关性 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)* 2013 41(1): 33-9.
- [8] 杨莉佳,王江,石秋燕,等. SCF E3 泛素化连接酶的研究进展 [J]. *四川生理科学杂志* 2014 36(3): 122-4.
- [9] Hicks S W, Galán J E. Hijacking the host ubiquitin pathway: structural strategies of bacterial E3 ubiquitin ligases [J]. *Curr Opin Microbiol* 2010 13(1): 41-6.
- [10] Collins C A, Brown E J. Cytosol as battleground: ubiquitin as a weapon for both host and pathogen [J]. *Trends Cell Biol* 2010 20(4): 205-13.
- [11] Lin D Y, Diao J, Zhou D, et al. Biochemical and structural studies of a HECT-like ubiquitin ligase from *Escherichia coli* O157: H7 [J]. *J Biol Chem* 2011 286(1): 441-9.

The E3 ubiquitin ligase activity identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* z2151 effector

Chen Fanghong^{1,2}, Li Tao², Li Zhan², et al

(¹*Institute of Microbiology and Epidemiology Academy of Military Medical Sciences, Anhui Medical University Hefei 230032*; ²*State Key Laboratory of Pathogens and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology Academy of Military Medical Sciences Beijing 100071*)

Abstract Objective To express z2151 protein in *E. coli* by genetic engineering methods, and to identify its E3 ubiquitin ligase activity. **Methods** The full-length z2151 were cloned from EHEC O157: H7 by PCR and were inserted into plasmid pET22b to construct the recombinant expression vector pET22b-z2151. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3) strains which were incubated for expression. And the recombinant protein was purified using Ni²⁺ + NTA Sephrose; the *in vitro* ubiquitination method was used to identify its ubiquitin ligase activity. **Results** The z2151 protein of high concentration and purity was obtained, and found its E3 ubiquitin ligase activity by which it could help ubiquitin to form polyubiquitin chains *in vitro* activity; what's more, the z2151 protein selectively interacted with human E2 ubiquitin conjugating enzymes. **Conclusion** The recombinant expression vector pET22b-z2151 has been constructed, and the protein z2151 shows good ubiquitin ligase activity. The experiments provide reference for the study of the functional mechanism in the future.

Key words genetic engineering; EHEC O157: H7; ubiquitin ligase; *in vitro* ubiquitination