

罗非鱼源无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)新型 AI-2 信号分子受体 RbsB 蛋白结晶生长研究*

樊博琳¹ 潘丽霞² 王忠良¹ 黎源¹ 简纪常^{1,3,4} 王蓓^{1,3,4}

(1. 广东海洋大学水产学院 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室 广东省水产经济动物病害控制重点实验室 湛江 524088; 2. 广西科学院 南宁 536000; 3. 中国科学院实验海洋生物学重点实验室 中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 4. 海洋生物学与生物技术功能实验室 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 青岛 266071)

摘要 为了开展无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)核糖结合蛋白(Ribose binding protein B, RbsB)结构功能的研究,本实验根据已知无乳链球菌 ZQ0910 全基因组序列设计相关引物。采用 PCR 方法扩增其 *RbsB* 基因,随后将该基因定向克隆到原核表达载体 pGEX-6p-1 中,在大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中进行 IPTG 诱导表达;采用 HRV 3C 蛋白酶切除 GST 标签,分子筛分离获得 RbsB 蛋白;运用生物信息学软件对 *RbsB* 基因序列进行分析,并对 RbsB 蛋白二级和三级结构进行预测;采用 NeXtal Tubes JCSG Core Suite 结晶试剂盒筛选蛋白结晶条件。研究结果表明,该基因全长为 969 碱基,编码 322 个氨基酸,RbsB 蛋白理论分子量 33.9ku,等电点为 9.41,二级结构中 螺旋结构所占比重最高,建立 RbsB 蛋白三维结构模式图;经 IPTG 诱导后表达的融合蛋白分子量为 59ku,筛选 RbsB 蛋白的初始结晶条件为(0.2mol/L di-Potassium hydrogen phosphate, 20% (W/V) PEG3350; 1.5mol/L ammonium sulfate, 25% (V/V) Glycerol),获得 RbsB 蛋白晶体。本研究结果可为无乳链球菌核糖结合蛋白(RbsB)的功能解析提供实验及理论基础。

关键词 无乳链球菌; RbsB 蛋白; 蛋白纯化; 结晶化

中图分类号 Q789 doi: 10.11693/hyh20190500103

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)是一类致病性革兰氏阳性细菌,又被称为 B 群链球菌(group B *Streptococcus*, GBS)。能引起人类败血症、脑膜炎等疾病及多种动物链球菌病(Pereira *et al*, 2010),也是近年引起罗非鱼链球菌病的主要病原菌。无乳链球菌诱发的罗非鱼发病率和死亡率极高,发病率一般达 20%—30%,发病鱼死亡率达 95%以上,严重影响了我国罗非鱼养殖业的经济效益(卢迈新等, 2010)。

AI-2 信号分子受体(呋喃酰硼酸二酯受体, Furanosyl borate diester receptor)在细菌识别和感知周围环境变化,并做出适应性反应(细菌密度感应系统, Quorum sensing, QS)的过程中发挥着重要的作用

(Bassler *et al*, 2006; 马艳平等, 2013)。迄今为止,研究者们已从遗传学、生物化学和生物信息学三个层面鉴定出了两种 AI-2 特异性表面结合受体(Chen *et al*, 2002; Miller *et al*, 2004),分别为 LuxP 蛋白和 LsrB 蛋白(Pereira *et al*, 2013)。然而,研究发现并不是所有细菌均存在以上两类受体蛋白。那么在其他种类的细菌中,由谁来担当 AI-2 信号分子受体呢?近年来,科学家们展开了一系列研究,Armbruster 等(2010)在分析伴放线放线杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)和流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)全基因组序列时,发现了一种被称作核糖结合蛋白 B(Ribose binding protein B, RbsB)的可溶性细胞周质蛋白家族

* 国家自然科学基金项目, 31702386 号; 广东省科技厅国际合作领域项目, 2017A050501037 号。樊博琳, 硕士研究生, E-mail: 2412258231@qq.com

通信作者: 王 蓓, 博士, 副教授, E-mail: wong19820204@126.com

收稿日期: 2019-05-31, 收修改稿日期: 2019-07-22

成员, 它们与大肠杆菌(*Escherichia coli*) LsrB 蛋白的核酸和氨基酸序列同源性分别达到了 86% 和 76%, 且与 LsrB 蛋白一样, 具有由 L-S-G-G-Q 氨基酸残基组成的高亲和力蛋白特征性模 Walker C(Armbruster *et al.*, 2010)。Armbruster 及其团队通过体外人工补充 AI-2 分子, 构建 *luxS* 和 *rbsB* 基因缺失株, 获得了流感嗜血杆菌生物膜形成表型的正负反馈调控的实验证据。综上所述, 推测 RbsB 可能是一种新型的细菌 AI-2 信号分子受体, 并在 AI-2 介导的 QS 系统中单独或与 LsrB 和 LuxP 经典受体共同发挥作用(Armbruster *et al.*, 2009, 2010, 2011)。

研究 AI-2 信号分子介导的细菌密度感应系统对于了解无乳链球菌毒力因子调控、生物膜结构稳定性及抗药性产生等生物学效应具有重要的意义, 也是寻找新型药物靶标的重要理论基础(马艳平等, 2013)。本研究以期获得无乳链球菌 RbsB 具有 AI-2 信号受体功能的可靠证据, 并开展对 RbsB 的 AI-2 分子受体功能分析及作用机制研究, 旨在为开发罗非鱼无乳链球菌病的新型抗菌候选药物提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

罗非鱼源无乳链球菌强毒株(*S. agalactiae*)ZQ 0910(中国微生物菌种保藏中心保藏编号为 CGMCC 7.264)由本实验室分离保存; 大肠杆菌表达菌株 BL 21(DE3)与 pGEX-6P-1 载体均为本实验室保存; 限制性核酸内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I, 克隆载体 pMD18-T, ExTaq DNA 聚合酶, T4 Ligase 购买自宝生物工程有 限公司(大连); 质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒和 PierceTM HRV 3C Protease Solution Kit 购买自赛默飞 尔科技(Thermo Fisher Scientific)公司; 引物、氨苄青霉 素(Ampicillin)、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)买自 生工生物工程有限公司(广州); 考马斯亮蓝快速染液购 买自全式金生物技术有限公司(北京), NeXtal Tubes JCSG Core Suite I, II, III, IV 为德国 QIAGEN 产品。

1.2 方法

1.2.1 提取细菌基因组 DNA 及扩增 *RbsB* 基因 提 取无乳链球菌基因组 DNA, 根据 GenBank 上已登录的 *RbsB* 基因序列(GenBank Accession: AP018935.1)设计特 异性引物 RbsBF/RbsBR, 引入酶切位点 *Bam*HI 和 *Xho*I, 引物由生工生物工程(广州)有限公司合成。

RbsBF: 5'-GGATCCATGAAATTTGGAAAAAACTT-3'
RbsBR: 5'-AAGTTTTTTTCCAAATTTTCATCTCGAG-3'

反应条件为: 94°C 预变性 5min, 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 90s, 共 30 个循环, 72°C 再延伸 10min。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物后再切胶回收, 连 接入 pMD18-T 载体, 菌落 PCR 鉴定后将阳性克隆送 生工生物工程股份有限公司(广州)测序。

1.2.2 构建重组质粒载体及诱导表达融合蛋白 PCR 扩增产物经纯化试剂盒纯化回收后用 *Bam*HI 和 *Xho*I 限制性内切酶进行双酶切, 对目的条带进行切 胶回收后定向插入经 *Bam*HI 和 *Xho*I 内切酶双酶切 的 pGEX-6P-1 质粒载体中, 构建重组质粒 pGEX-6p- 1-RbsB 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中, 涂布于 Amp⁺的 LB 琼脂平板, 37°C 条件下培养 12h, 从平板挑取单菌落于 Amp⁺的 LB 液体培养基中, 37°C、220r/min 培养 1h, 提取重组质粒送至测序(广 州生工)测序正确后, 进行菌落 PCR 鉴定和双酶切检 测, 检测正确后接种于新鲜的 Amp⁺的 LB 液体培养 基(比例 1:100)中, 37°C 继续震荡培养, 至 OD₆₀₀ 值达到 0.6—0.8, 加 IPTG(终浓度为 0.2mmol/L)进行 诱导表达。

1.2.3 重组融合蛋白表达条件的优化 将鉴定正 确的表达菌接种到 2mL Amp⁺的 LB 液体培养基中, 加入 IPTG 进行诱导(终浓度为 0.2mmol/L), 选择 16°C、30°C、37°C 三个温度条件下 220r/min 振荡培 养 4h 后离心收集菌体沉淀。经超声波破碎离心后分 别取样品上清液和菌体沉淀(溶于尿素中)并进行 3 个 相同条件的重复组, 用 SDS-PAGE 电泳分析目的蛋白 表达的最佳条件。

1.2.4 RbsB 蛋白纯化及鉴定 大量表达 pGEX- 6P-1-RbsB 重组融合蛋白, 离心收集菌体沉淀后用 Equilibration Buffer (50mmol/L Tris-HCl, 150mmol/L NaCl, 10% glycerol pH 8.0)溶液混悬, 超声波破碎并 高速离心制备菌体上清。取 3mL 谷胱甘肽琼脂糖树脂 (Glutathione Sepharose 4B)加入到 5mL 层析柱中, 层析 柱与 DH 电脑恒流泵和 HUXI 紫外检测仪连接。使用 50mL GST Equilibration Buffer 平衡层析柱 30min, 加入 制备好的菌体上清, 使菌体上清与谷胱甘肽琼脂糖树脂 静置结合 30min, 使用 GST Elution Buffer (50mmol/L Tris-HCl, 150mmol/L NaCl, 15mmol/L reduced glutathione pH 8.0)洗脱液进行洗脱, 根据紫外显示仪数字变化 (波长为 A_{280nm})收集洗脱液, 收集原始菌体上清液, 流穿液, 洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.5 切除融合表达蛋白 GST 标签 使用超滤浓 缩管(Milipore)(10kDa)浓缩收集到的蛋白洗脱液后,

用 Pierce™ HRV 3C Protease Solution Kit 试剂盒进行切除 GST 标签, 纯化后的重组蛋白 2900 μ L 中加入 HRV 3C Protease 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 冷藏过夜。用 AKTA™ purifier 全自动层析仪根据分子量大小不同分离 GST 标签与 Rbsb 蛋白, 收集洗脱峰对应样品, 用 SDS-PAGE 进行检测并采用蛋白定量试剂盒进行定量检测。

1.2.6 RbsB 基因序列分析 通过使用 DNAMAN 程序获得 RbsB 推导氨基酸序列; 使用 ExPASy (<http://expasy.org/tools/>)网址进行 RbsB 蛋白质理化性质分析; 使用 Softberry 程序对氨基酸功能位点进行预测; 使用 signalIP4.0 预测信号肽位置及剪切位点; 使用 InterProScan 程序 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>)进行结构域预测; 使用 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)网址进行蛋白二级结构预测, 并通过圆二色谱实验对预测结果进行验证(实验在持续氮气流的作用下, 对样品的圆二色谱变化进行测定, 扫描波长范围在 200—260nm 之间, 比色皿的光程为 0.5cm, 扫描速度为 50nm/min, 进行 3 次重复扫描); 使用 SWISS-MODEL 在线软件 (<http://www.expasy.org/>)对 RbsB 蛋白 3D 三级结构进行预测。

1.2.7 RbsB 蛋白的结晶条件筛选 将 RbsB 蛋白分别浓缩到 10mg/mL、20mg/mL 和 40mg/mL, 利用 NeXtal Tubes JCSG Core Suite (I, II, III, IV)蛋白结晶条件筛选试剂盒, 共 384 个结晶条件。对 RbsB 蛋白通过坐滴气相扩散法进行结晶条件的初步筛选, 将 RbsB 蛋白溶液与池液在晶体板的样品槽内 1:1 等比例混合, 用封膜密封, 置于 16 $^{\circ}$ C 恒温室中, 每 3 天通过显微镜观察蛋白液滴内晶体的生长情况。

2 结果

2.1 扩增 RbsB 基因片段以及构建可溶性表达载体

以无乳链球菌基因组 DNA 为模板, 用带酶切位点的引物扩增后, 获得一大约为 969bp 的目的条带 (图 1), 与预期相符。将测序正确的重组质粒用限制性核酸内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 进行双酶切, 图 2 中泳道片段大小分别约为 5000bp 和 969bp, 测序结果表明重组质粒构建成功。

2.2 RbsB 蛋白的表达条件优化

从图 3 中可以看出, 在保证其他实验条件相同情况下, 不同温度诱导融合蛋白的表达量和可溶性分析表明 37 $^{\circ}$ C 条件下 RbsB 全菌蛋白表达量高于 16 $^{\circ}$ C 和 30 $^{\circ}$ C 的表达量; 在沉淀中的融合蛋白表达量显著低于在上清中的表达量。进行 3 个重复组结果均

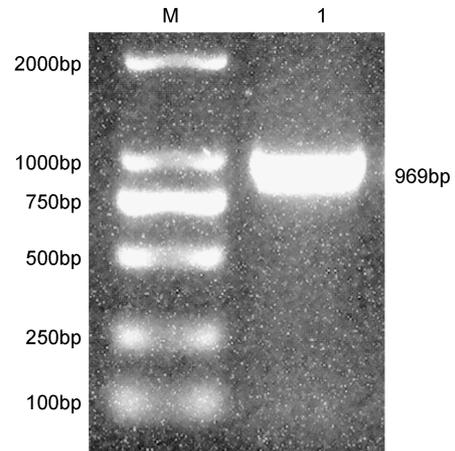


图 1 无乳链球菌 *RbsB* 基因的克隆

Fig.1 Cloning of *RbsB* gene from *S. agalactiae*
注: M: DL2000DNA 分子标准; 1: *RbsB* PCR 扩增产物

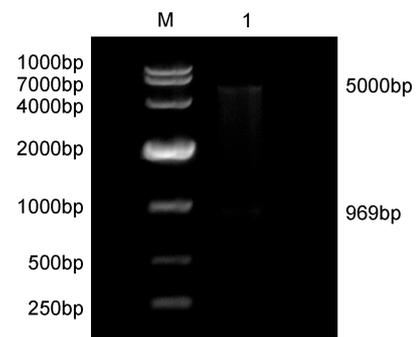


图 2 重组质粒 pGEX-6p-1-RbsB 的酶切鉴定

Fig.2 The result of pGEX-6p-1-RbsB digested by *Bam*HI and *Xho*I

注: M: DL10000 DNA 分子标准; 1: 酶切后产物

一致, 故该融合蛋白最佳诱导温度是 37 $^{\circ}$ C, 并选择在上清中进行纯化。

2.3 RbsB 蛋白的纯化及鉴定

将 pGEX-6P-1-RbsB 质粒转化入大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞中, 经优化条件(0.2mmol/L IPTG, 4h, 37 $^{\circ}$ C)诱导后, 根据紫外显示仪数字变化在第二个峰值处(波长为 A_{280nm})收集洗脱液(图 4)。分别取上清液、流穿液、洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。结果表明, 经过纯化后可以得到含量较高的融合蛋白(10.464mg/mL), 且在 59ku 处有一条明显蛋白条带(图 5), 与预期相符。

2.4 切除融合蛋白 GST 标签

将收集到的洗脱液浓缩至 3mL, 用试剂盒进行切除 GST 标签工作, 经谷胱甘肽琼脂糖树脂 (Glutathione Sepharose 4B)纯化后收集 3 管洗脱液, 分别与 HRV 3C Protease 过夜反应, SDS-PAGE 电泳结果表明, 本研究成功将 GST 标签从融合蛋白成除, 分别得到 GST 标签蛋白(26ku)和 RbsB 蛋白(33ku)。

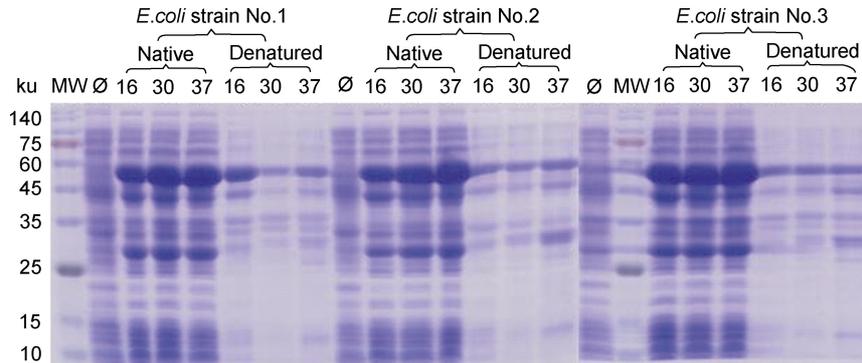


图3 不同温度诱导表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expression of the Rbsb fusion protein at different temperatures

注: MW: 蛋白分子量标准; Ø: 未进行诱导细菌表达(阴性对照)

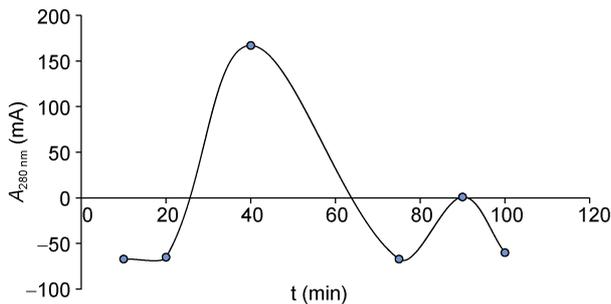


图4 紫外吸收图谱

Fig.4 The ultraviolet absorption spectrum

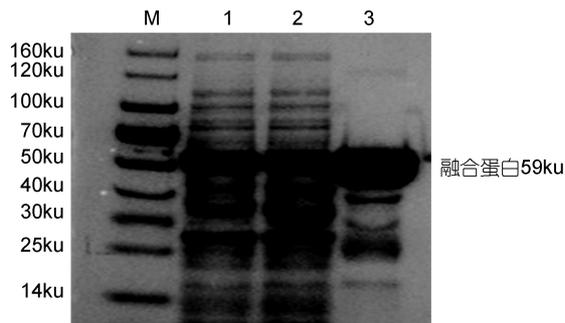


图5 重组蛋白 GST-RbsB 纯化后的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of purified GST-RbsB

注: M: 蛋白分子量标准; 1: 上清; 2: 流穿液; 3: 洗脱液

2.5 分子筛分离 RbsB 蛋白

将收集到的 3 管融合蛋白与 HRV 3C Protease 过夜反应上清浓缩至 2mL, 使用 AKTA™ purifier 全自动层析仪, 根据分子量大小不同彻底分离 GST-tag 与 RbsB 蛋白, 根据全自动层析仪电脑操作页面数据变化显示, 选取峰值处 10 管进行 SDS-PAGE 鉴定。结果显示第 1—6 管为 RbsB 蛋白(33ku), 第 7—10 管为 GST-tag(26ku) 与融合蛋白(59ku)混合液, 分子量大小正确(图 7)。

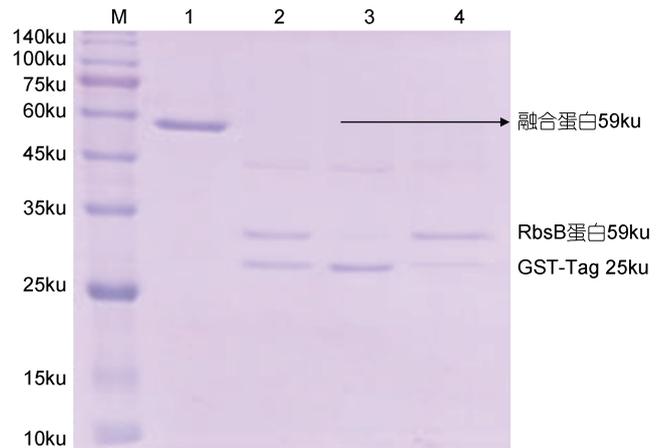


图6 GST-Rbsb 融合蛋白纯化及切除 GST 标签

Fig.6 Purity of GST-Rbsb fusion protein excision of GST-tag
注: M: 蛋白分子量标准; 1: 融合蛋白; 2—4: 融合蛋白与 HRV 3C Protease 过夜反应上清

2.6 RbsB 基因序列分析

RbsB 基因(GenBank Accession: AP018935.1)全长 969bp, 可编码 322 个氨基酸, ProtParam 分析 RbsB 推导氨基酸序列, RbsB 蛋白理论分子量 33.9ku, 等电点为 9.41, 其中丙氨酸(Ala)含量最高为 13.4%, 赖氨酸(Lys)其次为 11.8%。其中带正电荷的氨基酸有 42 个, 带负电荷的氨基酸有 31 个。SoftBerry-Psite 预测该序列功能位点, 发现该序列有 N-糖基化位点 4 个, cAMP-和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点 1 个, 蛋白激酶 C 磷酸化位点 5 个, 酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 2 个, N-豆蔻酰化位点 8 个, 酰胺化位点 3 个, 原核膜脂蛋白脂质附着部位 1 个, 微生物 C 末端靶向信号 7 个。signalIP4.0 预测 RbsB 存在信号肽, 1—24 为信号肽区域, 其中信号肽剪切位点在 24—25 氨基酸之间。

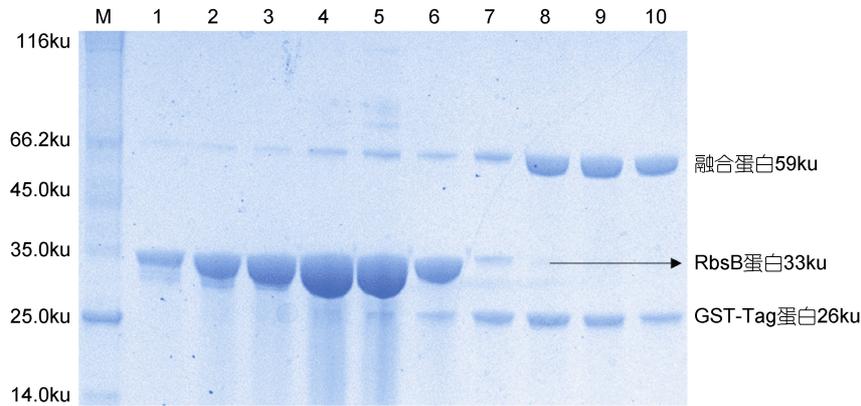


图7 使用 AKTA™ purifier 切除 GST 标签后 RbsB 蛋白的 SDS-PAGE 分析
Fig.7 SDS-PAGE analysis of single RbsB protein using AKTA™ purifier
注: M: 蛋白分子量标准; 1—6: RbsB 蛋白; 7—10: GST 标签与融合蛋白

2.7 RbsB 蛋白二级结构预测与验证

分析 RbsB 的二级结构, 从 RbsB 蛋白二级结构预测图(图 9)中可以看出 RbsB 蛋白的二级结构有: α -螺旋(46.27%)、无规卷曲(38.15%)、 β -折叠(15.22%)。蛋白质二级结构的变化情况可以用圆二色谱实验结果来说明, 已知 α -螺旋构象的 CD 谱在 222nm、208nm 处呈负峰, 在 190nm 附近有一正峰。结果显示所测二级结构具有明显的 α 螺旋结构且所占比重最高, 与预测结果一致。

2.8 RbsB 蛋白三级结构预测

用 InterProScan 程序分析预测结构域得在氨基酸 50—300 间有一结构域, 为周质结合蛋白区域。采用在线 SWISS-MODEL 程序对 RbsB 蛋白同源建模, 建模结果如图 11 所示, 其中三维图是以 2joy.1.A 为模版, 分别利用无乳链球菌 ZQ0910 菌株 RbsB 和大肠杆菌核糖结合蛋白 A 氨基酸序列 49—318 区域构建的三维结构, 相似性达到 47.78%。

2.9 RbsB 蛋白结晶条件初筛

通过蛋白质结晶条件筛选试剂盒 NeXtal Tubes JCSG Core (I, II, III, IV) 共计 384 个条件对 RbsB 蛋白进行了结晶条件的初步筛选。如图 12 所示, 在 NeXtal Tubes JCSG Core Suite III (0.2mol/L di-Potassium hydrogen phosphate, 20% (W/V) PEG3350) 和 NeXtal Tubes JCSG Core Suite IV (1.5mol/L ammonium sulfate, 25% (V/V) Glycerol) 条件下有晶体长出, 该晶体呈棱柱状较为规整, 对应于图 12 中 a、b, 提示有希望进一步优化获得可衍射的晶体。

3 讨论

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)不但肉质鲜嫩, 而且具有生长快、环境适应力强等优点, 受到了国内

外养殖户的青睐。但是近年随着养殖规模的不断扩大, 养殖环境的持续恶化, 链球菌病的大规模暴发, 严重影响了我国国内尼罗罗非鱼养殖业的发展(张新艳等, 2008; 黄锦炉, 2012)。罗非鱼链球菌病(*Streptococcosis*)具有高温好发、传染性高和死亡率高的特点, 其从属于细菌性疾病。在世界范围内其病原主要为无乳链球菌(*S. agalactiae*)和海豚链球菌(*S. iniae*), 无乳链球菌(*S. agalactiae*)是我国南方地区链球菌病的主要病原菌(王蓓等, 2013)。研究 AI-2 信号分子介导的细菌密度感应系统对于了解无乳链球菌毒力因子调控、生物膜结构稳定性及抗药性产生等生物学效应具有重要意义。本研究将对探索 RbsB 分子作为“第 3 类”AI-2 信号分子受体提供直接证据。

获得晶体的前提条件是得到纯度好、浓度高的可溶性蛋白, 因此在表达载体和表达菌株的选择上, 我们采用了可溶表达性更高的 pGEX-6P-1 载体, 并采用大肠杆菌 BL21 作为表达菌株。pGEX-6P-1 表达载体自带 GST 融合标签, 具有一定的溶解度在大肠杆菌中, 同时还参与了体系中二硫键还原等过程, 为后续蛋白质的纯化与鉴定提供了方便(Maina *et al.*, 1988; Sharrocks, 1994)。重组蛋白用大肠杆菌 BL21(DE3) 表达有两种形式; 一种表达形式是以包涵体出现, 另外一种是可溶性表达, 即重组蛋白存在于上清中。经过 SDS-PAGE 实验验证 3 组重复试验均显示在上清中表达量明显高于在包涵体中的表达量, 故实验选择在上清中表达利于后续蛋白纯化工作, 获得有活性的 RbsB 蛋白。

重组融合蛋白的表达水平不仅与宿主和表达载体有关, 也和诱导条件有着密切的关系(Sharrocks, 1994)。其中一个重要的影响条件是诱导温度, 在诱导

```

1   ATGAAATTTGGAAAAAACTTGGCTTTCTAGCCTTATTGATGTCTATTGTCCTCATTCTA
1   M K F G K K L G F L A L L M S I V L L L
61  GGTGCATGTGGTAAAACCTGGACTTGGAAATTTCTTCTGGGAATTCTACAAAAAATGTAACC
21  G A C G K T G L G N S S G N S T K N V T
121 AAAAAATCTGCTAAAGATTTGAAACTAGGTGTATCTATTTCAACAATAACAATCCCTAC
41  K K S A K D L K L G V S I S T T N N P Y
181 TTTGTTGCGATGAAAGACGGTATTGACAAATATGCTAGCAATAAAAAAATAAGCATTAAAG
61  F V A M K D G I D K Y A S N K K I S I K
241 GTAGCTGATGCTCAAGATGACGCCGACGTCAGCAGATGATGTCCAAAACCTTTATTAGT
81  V A D A Q D D A A R Q A D D V Q N F I S
301 CAAAACGTAGATGCTATTTTGATTAATCCCGTTGACTCAAAGCTATTGTAACAGCTATT
101 Q N V D A I L I N P V D S K A I V T A I
361 AAGTCTGCAACAACGCTAATATTCTCTGTTATTCTAATGGACCGTGGTAGTGAGGGAGGC
121 K S A N N A N I P V I L M D R G S E G G
421 AAAGTATTAACACTGTGCTTCAGATAACGTTGCTGCTGGTAAGATGGCTGCGGATTAT
141 K V L T T V A S D N V A A G K M A A D Y
481 GCCGTTAAAAACTAGGCAAAAAGCAAAGCCTTTGAATTATCTGGAGTACCAGGTGCC
161 A V K K L G K K A K A F E L S G V P G A
541 TCTGCTACTGTAGACCGTGGTAAAGGATTTTCATTGCAAAATCTAAACTTGACATC
181 S A T V D R G K G F H S V A K S K L D I
601 CTTTCAAGCCAATCTGCCAATTTTGACCGCGCAAAGCCTTTGAATACTACACAAAATATG
201 L S S Q S A N F D R A K A L N T T Q N M
661 ATTCAAGGACATAAAGATGTCCAAATTTTTCGCACAAAATGATGAAATGGCACTTGGG
221 I Q G H K D V Q I I F A Q N D E M A L G
721 GCTGCACAGGCTGTCAAATCTGCTGGCTTGCAAAATGTTCTTATCGTAGGAATTGATGGT
241 A A Q A V K S A G L Q N V L I V G I D G
781 CAGCCAGATGCCATGATGCCATTAATAAAGGAGATATTTGAGCCACTATTGCACAACAA
261 Q P D A H D A I K K G D I S A T I A Q Q
841 CCAGCTAAGATGGGAGAAATAGCAATTCAAGCAGCAATTGATTATTATAAAGGCAAAAAA
281 P A K M G E I A I Q A A I D Y Y K G K K
901 GTAGAGAAAGAAACAATTTCTCCAATTTACCTGTACCAAAGACAATGTTGAAAAATAC
301 V E K E T I S P I Y L V T K D N V E K Y
961 AATTGGTAA
321 N W *

```

图 8 *RbsB* 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列和功能位点

Fig.8 Open reading frame and deduced amino acid sequences of *RbsB* gene

注:“—”N-糖基化位点;“—”cAMP-和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点;“■”蛋白激酶 C 磷酸化位点;“- - -”酪蛋白激酶 II 磷酸化位点;“...”N-豆蔻酰化位点;“~”酰胺化位点;“...”原核膜脂蛋白脂质附着部位;“—”微生物 C 末端靶向信号;“*”终止子

过程中温度会影响氧的溶解度快慢、并对酶的反应速率造成加快或减慢,进而影响蛋白的活性。本实验通过固定其他因子,对单个因子温度进行 16°C、30°C、37°C 三个条件进行诱导,经 SDS-PAGE 验证 37°C 表达量最佳。为了降低诱导剂 IPTG 对大肠杆菌代谢的毒性作用,用终浓度为 0.2mmol/L 的 IPTG 诱导蛋白表达,诱导时间为 4h,用 Glutathione Sepharose 4B 亲

和树脂纯化重组蛋白,结果测得在上清中取得了 10.464mg/mL 较高的重组蛋白表达量。使用 Pierce™ HRV 3C Protease 切掉 GST-tag 然后经 AKTA™ purifier 全自动层析仪按分子量大小将 Rbsb 蛋白与 GST-tag 分离开。SDS-PAGE 检测表观彻底将 RbsB 蛋白与 GST-tag 分离开,成功获取到纯度很高的 RbsB 蛋白。

```

      10      20      30      40      50      60      70
MKFGKLGFLALLMSIVLILGACGKTGLGNSSGNSTKNVTKKSAKDLKLGVSISTTNNPYFVAMKDGDK
cccccechhhhhheeeeeccccccccccccccccchhhhhhhheeeeeccccccccccccchhh
YASNKIKSIVADAQDDAARQADDVQNFISQNVDAILINPVDSKAIVTAIKSANNANIPVILMDRGSEGG
hhccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
KVLTTVASDNVAAGKMAADYAVKKGKAKAFELSGVPGASATVDRGKGFHSVAKSKLDLSSQSANFDR
eeeeeeccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
AKALNTTQNMIQGHKDVQIIFAQNDDEMALGAAQAVKSAGLQNVLIVGIDGQPDADHDAIKKGDISATIAQQ
hhhhchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
PAKMGELAIQAAIDYKGGKVEKETISPIYLVTKDNVEKYNW
hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh

```

图 9 无乳链球菌 RbsB 蛋白二级结构预测
 Fig.9 Predicted secondary structure of RbsB protein
 注：“c”；无规卷曲；“e”；β-延伸；“h”；α-螺旋

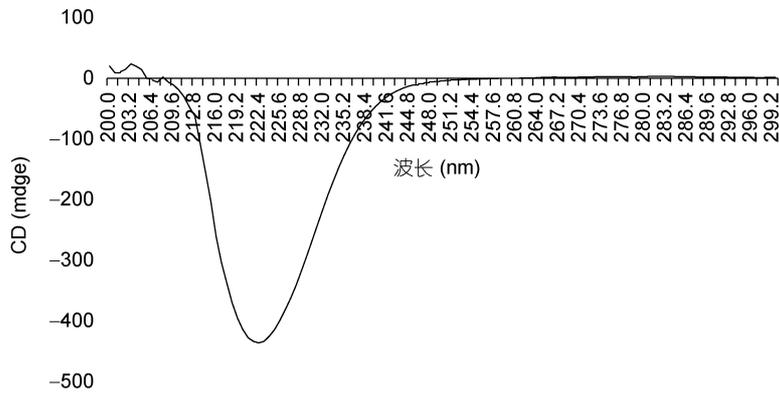


图 10 圆二色谱测 RbsB 蛋白二级结构
 Fig.10 Determination of secondary structure of RbsB protein by circular dichroism

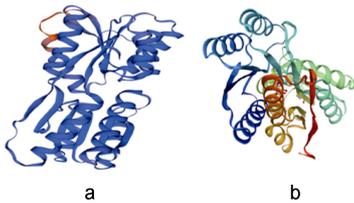


图 11 无乳链球菌 RbsB 蛋白(a)与大肠杆菌周质糖结合蛋白 A(b)蛋白三维结构预测图

Fig.11 Three-dimensional structure prediction

注: a. *Streptococcus agalactiae* RbsB protein; b. *Escherichia coli* Periplasmic sugar-binding protein A protein

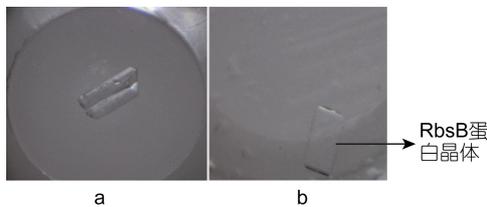


图 12 RbsB 蛋白结晶体

Fig.12 The crystallization of RbsB protein

生物信息学是研究基因组学和蛋白质组学的重要工具，是一门检索、储存并分析生物信息的科学，

它将信息技术应用到了生命科学领域。本研究对 RbsB 蛋白进行了一系列基因序列分析包括：蛋白质理化性质分析；氨基酸功能位点进行分析；预测信号肽位置及剪切位点；预测结构域；进行蛋白二级结构和蛋白 3D 三级结构预测等工作。通过氨基酸功能位点分析可知蛋白激酶 C 磷酸化位点 5 个，N-豆蔻酰化位点 8 个以及微生物 C 末端靶向信号 7 个(数量最多)蛋白激酶 C 能作用于细胞核中的转录因子，能激活细胞质中的靶酶参与生化反应的调控，参与细胞生长和分化相关的基因表达的调控(周小东等, 2013); 而 N-豆蔻酰化位点和微生物 C 末端靶向信号位点也在信号转导中起着重要作用，更为验证了 RbsB 可能是一种新型的细菌 AI-2 信号分子受体，并在 AI-2 介导的 QS 系统中单独或与 LsrB 和 LuxP 经典受体共同发挥作用这一推测。通过二级结构预测和圆二色谱实验发现 螺旋结构所占比重最高，而螺旋结构是蛋白质构象中最稳定的一种结构，不论是长链还是短链，也不论螺旋相互作用是强还是弱，一旦螺旋结构形成，在拉伸过程中都能保持螺旋结构的稳定性，这无疑为后续蛋白晶体优化实验提供了保证。

20 世纪 70 年代初期, 中国科学工作者测定了亚洲地区第一个蛋白质晶体结构-猪胰岛素三方二锌晶体结构, 成为中国结构生物学历史发展的起点, 进入新世纪后该学科更是展现出快速发展姿态(王大成, 2014)。本研究利用蛋白质结晶试剂盒 NeXtal Tubes JCSG Core (I, II, III, IV) 共计 384 个条件筛选出了两个可形成柱状晶体的条件, 从结晶筛选条件和晶体外观可判断出这些晶体应为蛋白晶体, 说明 RbsB 蛋白具备可结晶性。柱状蛋白晶体相比较针状蛋白晶体来说, 其通常衍射能力较强, 可以满足后期收集较高分辨率数据的需要。对于单颗晶体, 我们也经常可以对采用多点收集以及螺旋收集(helical collection)的方法来获得更好的数据质量与分辨率(闫创业, 2014)。为了能够得到良好的衍射数据, 我们拟在后续实验中, 以上述筛选到的结晶条件为基础, 继续优化结晶条件, 以提升获得可用于衍射数据收集的高质量 RbsB 晶体的概率, 关于 RbsB 蛋白晶体, 我们将从功能位点进行分析并辅以细菌表型的研究从而确认其受体功能, 旨在为寻找新型药物靶标的重要理论基础。

4 结论

本研究成功克隆 *RbsB* 基因, 该基因全长 969 碱基, 编码 322 个氨基酸, 二级结构中 α 螺旋结构所占比重最高, RbsB 蛋白理论分子量 33.9ku, 筛选到 RbsB 蛋白的初始结晶条件为: 0.2mol/L di-Potassium hydrogen phosphate, 20% (W/V) PEG3350; 1.5mol/L ammonium sulfate, 25% (V/V) Glycerol, 获得 RbsB 蛋白晶体。本研究结果可为无乳链球菌核糖结合蛋白(RbsB)的功能解析提供实验及理论基础, 将从功能位点进行分析并辅以细菌表型的研究从而确认其受体功能, 旨在为寻找新型药物靶标的重要理论基础。

参 考 文 献

马艳平, 李嘉彬, 郝乐等, 2013. 罗非鱼源无乳链球菌 S-核糖基高半胱氨酸酶基因(*luxS*)的克隆及其推导蛋白的三维结构预测. 南方水产科学, 9(1): 43—47
王蓓, 简纪常, 鲁义善等, 2013. 罗非鱼源无乳链球菌 ZQ0910 转录调控因子 *rovS* 基因的克隆及表达研究. 水产

学报, 37(4): 584—592
王大成, 2014. 结构生物学研究在中国. 生物化学与生物物理进展, 41(10): 944—971
卢迈新, 黎炯, 叶星等, 2010. 广东与海南养殖罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析. 微生物学通报, 37(5): 766—774
闫创业, 2014. 蛋白质晶体学中的相位解析优化以及三维模型构建的研究. 北京: 清华大学博士学位论文
张新艳, 樊海平, 钟全福等, 2008. 罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定及致病性研究. 水产学报, 32(5): 772—779
周小东, 沈富兵, 2013. MAP30 蛋白结构功能的生物信息学研究. 广西植物, 33(4): 560—563, 542
黄锦炉, 2012. 罗非鱼无乳链球菌病原学、病理学及 *cpsE* 基因的原核表达研究. 雅安: 四川农业大学博士学位论文
Armbruster C E, Hong W Z, Pang B *et al*, 2009. LuxS promotes biofilm maturation and persistence of nontypeable *Haemophilus influenzae* in vivo via modulation of lipooligosaccharides on the bacterial surface. Infection and Immunity, 77(9): 4081—4091
Armbruster C E, Hong W Z, Pang B *et al*, 2010. Indirect pathogenicity of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in polymicrobial otitis media occurs via interspecies quorum signaling. mBio, 1(3): e00102-10
Armbruster C E, Pang B, Murrah K *et al*, 2011. RbsB (NTHI_0632) mediates quorum signal uptake in nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 86-028NP. Molecular Microbiology, 82(4): 836—850
Bassler B L, Losick R, 2006. Bacterially speaking. Cell, 125(2): 237—246
Chen X, Schauder S, Potier N *et al*, 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. Nature, 415(6871): 545—549
Maina C V, Riggs P D, Grandea III A G *et al*, 1988. An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. Gene, 74(2): 365—373
Miller S T, Xavier K B, Campagna S R *et al*, 2004. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. Molecular Cell, 15(5): 677—687
Pereira C S, Thompson J A, Xavier K B, 2013. AI-2-mediated signaling in bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 37(2): 156—181
Pereira U P, Mian G F, Oliveira I C M *et al*, 2010. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. Veterinary Microbiology, 140(1—2): 186—192
Sharrocks A D, 1994. A T7 expression vector for producing N- and C-terminal fusion proteins with glutathione S-transferase. Gene, 138(1—2): 105—108

CRYSTAL GROWTH OF NOVEL AI-2 SIGNALING MOLECULE RECEPTOR RBSB PROTEIN FROM *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

FAN Bo-Lin¹, PAN Li-Xia², WANG Zhong-Liang¹, LI Yuan¹, JIAN Ji-Chang^{1,3,4}, WANG Bei^{1,3,4}

(1. Fisheries College of Guangdong Ocean University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Key Laboratory of Control for Diseases of Aquatic Economic Animals of Guangdong Higher Education Institutes, Zhanjiang 524088, China; 2. Guangxi academy of Science, Nanning 536000, China; 3. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 4. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China)

Abstract To understand the structural function of the RbsB (Ribose binding protein B, RbsB) protein in *Streptococcus agalactiae*, we designed primers according to the related genes registered on GenBank, and amplified the *RbsB* gene of the strain by PCR (polymerase chain reaction). The gene was directionally cloned into the prokaryotic expression vector pGEX-6p-1. In addition, we carried out IPTG-induced expression in *E. coli* BL21 (DE3) competent cells, isolated a single RbsB protein by excising GST-tag with a kit (PierceTM HRV 3C Protease Solution Kit), analyzed the *RbsB* gene sequence with bioinformatics software, predicted the secondary tertiary structure of RbsB protein, and screened the protein crystallization conditions in the NeXtal Tubes JCSG Core Suite crystallization kit. The results show that the full-length of the gene was 969bp and 322aa, the theoretical molecular weight of RbsB protein was 33.9ku, and the isoelectric point was 9.41. The α -helix structure had the highest proportion in the secondary structure, and the three-dimensional structure pattern of RbsB protein was established; the molecular weight of the fusion protein was 59ku, the RbsB protein crystals could be obtained by initial crystallization conditions for screening (0.2mol/L di-Potassium hydrogen phosphate, 20% (W/V) PEG3350; 1.5mol/L ammonium sulfate, 25% (V/V) Glycerol). Thus, the RbsB protein crystals have been successfully obtained, which lays a foundation for the later study of the structure and function of RbsB protein.

Key words *Streptococcus agalactiae*; RbsB protein; protein purification; crystallization