

灵芝免疫调节蛋白 LZ-8 的制备和晶体分析

安敏, 高福, 齐建勋, 李锋, 刘杏忠

中国科学院微生物研究所 真菌地衣系统学重点实验室, 北京 100101

摘要: LZ-8 蛋白是从灵芝菌丝中分离到的真菌免疫调节蛋白, 具有多种免疫调节功能, 然而这一蛋白的作用机制尚不清楚。通过蛋白质晶体结构的解析, 能够得到蛋白质空间结构特点, 从而阐述蛋白质功能的机制。旨在得到 LZ-8 蛋白的晶体, 并获得空间结构数据。以 pET21a 为表达载体, 获得诱导表达的 rLZ-8, 通过亲和层析、分子筛凝胶层析和阴离子交换层析纯化, 蛋白纯度在 98% 以上, 采用悬滴气相扩散法得到蛋白晶体, 并获得 3.2Å 数据, 为进一步对真菌免疫调节蛋白功能和结构的研究奠定了基础。

关键词: LZ-8, 真菌免疫调节蛋白, 晶体衍射

Expression and crystallographic studies of a fungal immunomodulatory protein LZ-8 from a medicinal fungus *Ganoderma lucidum*

Min An, George Fu Gao, Jianxun Qi, Feng Li, and Xingzhong Liu

Key Laboratory of Systematic Mycology and Lichenology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: LZ-8 protein, isolated from a well known Chinese traditional medicinal fungus *Ganoderma lucidum*, is the first member of fungal immunomodulatory protein, members of which have been isolated from a variety of medicinal and edible mushrooms in the last two decades. The protein plays a multifunctional and important role in modulating immune system. In this report, in order to get LZ-8 protein crystals, the LZ-8 gene was expressed and purified by affinity chromatography, gel filtration chromatography and anion exchange chromatography subsequently. The protein was then crystallized using the hanging-drop vapour-diffusion method. The LZ-8 crystals were obtained and the phase information was calculated by X-ray diffraction. The resolution of LZ-8 crystals is 3.2Å. This study will provide an insight into the structure of fungal immunomodulatory proteins.

Keywords: LZ-8, fungal immunomodulatory protein, crystal diffraction

担子菌纲多孔菌目灵芝属的灵芝 *Ganoderma lucidum* 是传统中医学中被广泛应用的一种中药材, 在我国的众多古典医学资料中都对它有详尽的描述。作为一种重要的中药材, 灵芝在抗肿瘤、保肝

解毒、治疗心血管系统疾病、抗神经衰弱作用、抗菌消毒以及抗衰老等多种临床应用方面具有良好的效果^[1]。经过研究分析, 灵芝中的主要有效化学成分包括多糖类化合物、甾、萜类化合物、生物碱、

Received: April 21, 2010; Accepted: May 10, 2010

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA021506).

Corresponding author: Xingzhong Liu. Tel: +86-10-64807505; E-mail: liuxz@im.ac.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA021506) 资助。

氨基酸和蛋白质等多种物质^[1]。其中在灵芝中发现的真菌免疫调节蛋白 LZ-8 (LingZhi-8)^[2]成为了近几年来研究的热点。

1989 年日本科学家 Kino 首次从灵芝菌丝体中提取到了一个由 111 个氨基酸构成的 12 kDa 大小的小分子蛋白——LZ-8 蛋白。之后,科学家又从药、食用真菌松杉灵芝 *G. tsugae*^[3]、金针菇 *Flammulina velutipes*^[4]、草菇 *Volvariella volvacea*^[5]、牛樟芝 *Antrodia camphorata*^[6]、紫芝 *G. sinensis*^[7]等真菌菌丝或子实体中提取到了性质、功能与 LZ-8 非常相似的蛋白,科学家将这一类蛋白归为同一个蛋白家族,命名为真菌免疫调节蛋白 (Fungal immunomodulatory protein, FIP) 家族。以 LZ-8 为代表的这一蛋白家族具有很多类似的免疫调节功能。在体外, LZ-8 可以刺激 DBA/2 小鼠^[8]、非肥胖性 I 型糖尿病小鼠脾淋巴细胞^[9]增殖,促进单核细胞起源的树突状细胞 (DC) 的活化和成熟^[10],而且用酵母异源表达的 LZ-8 蛋白可以促进巨噬细胞的吞噬作用^[11]。这种增殖功能也有类似于凝集素的剂量依赖特点,但不会因为多糖或者单糖的加入而受到抑制^[2]。在体内, LZ-8 蛋白可以防止非肥胖性 I 型糖尿病小鼠由自身免疫系统缺陷造成的胰腺炎的发生^[9],同时也能够抑制阿尔图斯 (Arthus) 过敏反应^[2],可能原因是 LZ-8 蛋白能够抑制由特殊抗原引起的抗体产生^[12],因此在移植外源胰脏的小鼠体内腹腔注射 LZ-8 蛋白可以抑制胰脏的排异反应,延长小鼠寿命^[13]。此外, LZ-8 蛋白可以促进黏附分子 ICAM-1 的表达^[14],从而促进了免疫分子与其他细胞分子间的相互黏合,以达到发挥免疫调节的功能。同时,与 LZ-8 蛋白氨基酸序列完全相同的松杉灵芝免疫调节蛋白 (FIP-gts) 可以促进人类外周血淋巴细胞分泌白介素 2 (IL-2)、白介素 4 (IL-4)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和干扰素 γ (INF- γ) 等细胞因子^[3],调节人类体液免疫。

虽然以 LZ-8 蛋白为代表的真菌免疫调节蛋白家族的功能已经得到了多方面的研究,然而这类蛋白的作用机制仍没有得到很好的阐述。由于蛋白质的高级结构决定了蛋白质所具有的功能,因此对蛋白质三维结构的研究能够从本质上揭示蛋白的作用机制。2003 年,该家族的第一个晶体结构——金

菇免疫调节蛋白 (FIP-fve) 的晶体结构被解析,对这个家族蛋白的结构特点有了初步了解,然而并不能完全解释该蛋白家族功能机制^[15-17]。本研究通过原核系统大量表达重组 LZ-8 蛋白,采用悬滴气相扩散法得到蛋白结晶,利用 X-光晶体衍射技术获得 LZ-8 蛋白在分辨率为 3.2 Å 空间结构的信息。

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

灵芝 *G. lucidum* 菌种 444 为中国科学院微生物研究所文华安教授提供;克隆宿主菌 *E. coli* DH5 α , 表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3), 表达质粒 pET21a 均由本实验室保存。

1.2 化学试剂和材料

蛋白胨、酵母抽提物购自 Oxoid 公司。各种工具酶、混合 dNTPs、DNA 电泳分子量标准、pMD18-T simple 载体购自大连 TaKaRa 公司。质粒提取试剂盒购自北京博大泰克生物技术公司。DNA 凝胶回收试剂盒购自 Promega 公司。Ni-NTA Agarose 购自 GE 公司。BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自 Thermo Fisher 公司。分子筛柱 Superdex 75 10/300 GL 和阴离子交换柱 Resource Q 均为 Amersham Bioscience 公司生产。晶体初筛试剂盒购自 Hampton Research 公司。引物合成和测序反应由上海英骏生物技术有限公司完成。其他各种化学试剂为进口或国产分析纯试剂。

1.3 培养基

LB 培养基: NaCl 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母抽提物 5 g/L, Amp 终浓度 100 μ g/mL。PDA 综合培养基: 葡萄糖 20 g/L; 蛋白胨 3.0 g/L; KH₂PO₄ 3.0 g/L; MgSO₄·7H₂O 1.5 g/L; 维生素 B₁ 20 mg/L; 马铃薯浸取液 (去皮马铃薯 200 g, 切成小块, 加水 1.0 L 煮沸 30 min, 滤去马铃薯块, 将滤液补足至 1.0 L); pH 6.0。

1.4 重组质粒 pET21a-LZ-8 的构建

将菌种 444 在 PDA 综合培养基培养 2 周后,收集菌丝球。由于 LZ-8 基因中不含内含子^[2],因此利用酚-氯仿法提取菌种的基因组 DNA 作为 PCR 反应的模板。PCR 反应条件如下: 95°C 3 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s, 循环 30 次; 72°C 10 min。

PCR 引物如下: F: 5'-GGAATTCCATATGATGTCCGACACTGCCTTGAT-3', R: 5'-GGAATTCCTTAATGATGATGATGATGAGTCCACTGGGCG-3'。引物 R 含有表达 6 个 His 的序列, F 和 R 分别含有 *Nde* I 和 *Eco*R I 的限制性酶切位点 (下划线部分为酶切位点), 将扩增后的目的片段经过酶切、纯化连接到表达载体 pET21a 上, 构建重组质粒 pET21a-LZ-8。重组质粒通过酶切鉴定和 DNA 测序来确保其准确性。

1.5 rLZ-8 蛋白的表达纯化

将重组质粒转化入 BL21(DE3) 感受态细胞中, 在 37°C 条件下用 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h, 得到可溶性表达的目的蛋白。大量摇菌、超声破碎后, 将离心得到的上清与 Ni-NTA Agarose 结合 2 h。之后用 200 mmol/L 的咪唑溶液洗脱目的蛋白。浓缩后进一步通过凝胶层析法和阴离子交换层析得到纯化的带有 His-tag 的 rLZ-8 蛋白。

1.6 rLZ-8 蛋白的晶体生长

利用结晶试剂盒, 采用悬滴法筛选 rLZ-8 蛋白晶体培养条件。通过初筛条件, 改变沉淀剂浓度、盐浓度、pH 值以及蛋白浓度进行优化。最终在沉淀剂为 0.6 mol/L 酒石酸钾钠 (Potassium sodium tartrate), 缓冲液 0.1 mol/L 1,3-二 [三 (羟甲基) 氨基] 丙烷 (Bis-tris propane), pH 7.5 的条件下获得可供衍射的晶体, 此时蛋白浓度为 5 mg/mL。

1.7 解析结构方法

利用分子置换法解析结构。

2 结果

2.1 重组质粒 pET21a-LZ-8 的构建和表达

利用灵芝的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到 LZ-8 基因片段, 纯化回收后将其连接在 pMD18-T simple 载体上, 经菌落 PCR 和双酶切鉴定后, 挑取阳性克隆, 提取质粒, 并利用 *Nde* I 和 *Eco*R I 进行双酶切。回收纯化双酶切后获得的片段, 连接到 pET21a 载体中。将连接产物转化入大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性克隆, 提质粒进行双酶切鉴定, 最后进行测序验证, 最终获得重组质粒命名为 pET21a-LZ-8 (图 1)。

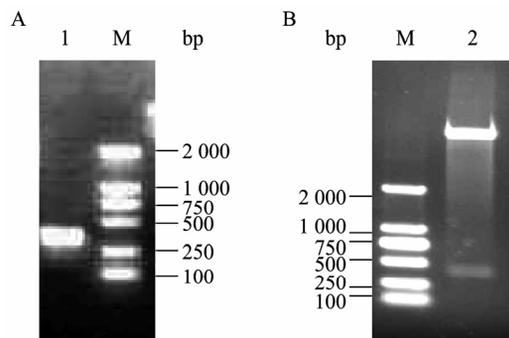


图 1 LZ-8 基因 PCR 扩增及重组质粒双酶切鉴定

Fig. 1 PCR amplification of LZ-8 gene and double enzyme digestion of the recombinant plasmid. (A) PCR amplification of LZ-8 gene. M: DNA marker; 1: PCR product of LZ-8. (B) Double enzyme digestion of the recombinant plasmid. M: DNA marker; 2: double enzyme digestion of pET21a-LZ-8 by *Nde* I and *Eco*R I.

2.2 rLZ-8 蛋白的表达纯化

将测序鉴定正确的重组质粒转入表达宿主菌 BL21(DE3) 中, 挑取单克隆后液体培养, 在 OD_{500} 达到 0.4-0.6 之间时加入 1 mmol/L IPTG 进行诱导表达。SDS-PAGE 分析表明, 在接近 14 kDa 处有一条明显的目的蛋白带。超声裂解细菌后离心, 目的蛋白以可溶性蛋白形式存在, 表达量很高 (图 2)。

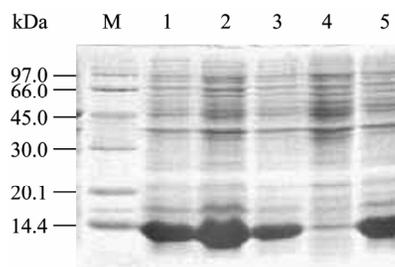


图 2 SDS-PAGE 分析 rLZ-8 表达产物

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expression of rLZ-8. M: protein marker; 1-3: rLZ-8 expression after induced by IPTG; 4: negative control; 5: the supernatant after sonicating the cells expressing rLZ-8.

将超声裂解细菌的产物在 4°C 下 16 000 r/min 高速离心 10 min, 取上清与 Ni-NTA Agarose 结合 4 h, 用 50 mmol/L 咪唑溶液清洗结合到层析柱上的杂蛋白直到蛋白检测液不再变蓝, 之后用 200 mmol/L 的咪唑溶液将目的蛋白洗脱。浓缩洗脱下来的目的蛋白至体积约为 5 mL, 加样至 Superdex 75 10/300 GL 进行凝胶层析。主峰中的样品经 SDS-PAGE 验证是 LZ-8 重组蛋白。蛋白出峰位置的分子量约为 28 kDa,

是蛋白形成二聚体后的分子量大小,即带有 His-tag 的 rLZ-8 蛋白与天然状态的 LZ-8 蛋白一样是以二聚体形式存在 (图 3)。将主峰中的蛋白收集,浓缩到 5 mL 左右,再通过阴离子交换层析进一步纯化。通过 SDS-PAGE 的验证,阴离子交换层析主峰中的蛋白为目的蛋白 (图 4)。

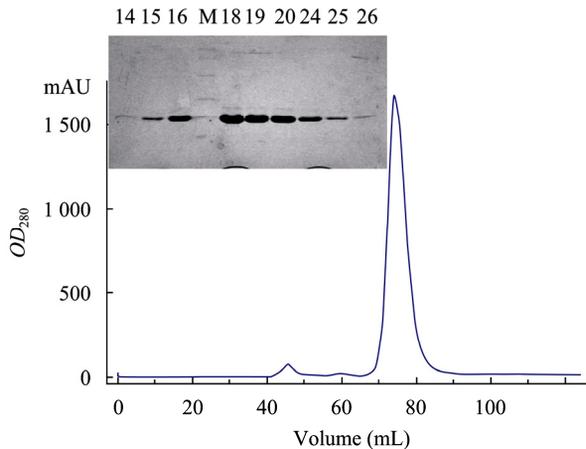


图 3 rLZ-8 蛋白分子筛层析图

Fig. 3 Superdex 75 gel filtration profile of the rLZ-8 protein. The main peak is rLZ-8 protein.

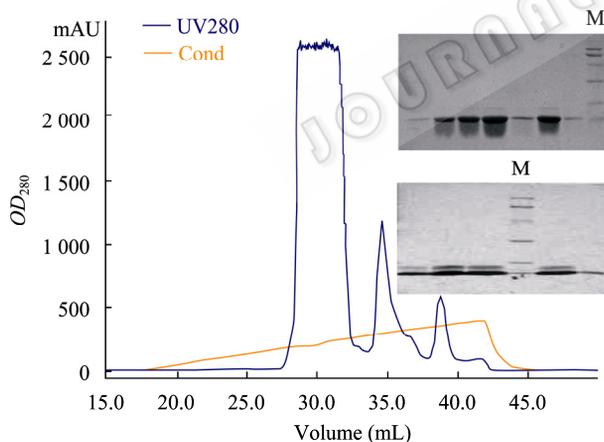


图 4 rLZ-8 蛋白阴离子交换层析图

Fig. 4 Further purification of the rLZ-8 protein by anion exchange. M: protein marker. The main peak is rLZ-8 protein.

2.3 rLZ-8 蛋白晶体的生长

将阴离子交换层析纯化后主峰中的蛋白浓缩至 5 mg/mL 的浓度,利用悬滴法以及晶体试剂盒对蛋白进行晶体形成条件初筛。在初筛约 24 h 后,观察发现在 Salt 以及 Crystal 试剂盒的 22 个条件有晶体长出,利用 X-ray 衍射鉴定是蛋白质晶体。初筛时的蛋白晶体个体较小,形状不规则,很多小晶

体混杂生长在一起,衍射率较低 (图 5A)。之后,对初筛时晶体生长较大、较结实的条件进行盐离子浓度和 pH 值的梯度优化,在 0.6 mol/L 酒石酸钾钠沉淀剂、0.1 mol/L Bis-tris propane 缓冲液 (pH 7.5) 的条件下得到了分辨率为 3.2 Å 的晶体。经过优化的晶体个体较大,形状为较规则的六边形,晶体为单个晶体,而且比较厚实,分辨率较高 (图 5B)。

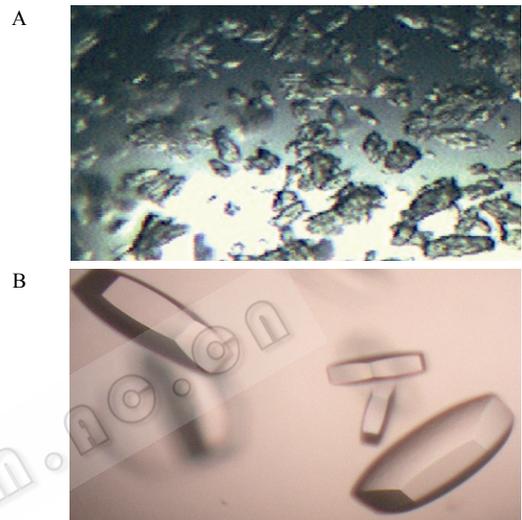


图 5 初筛 (A) 及优化 (B) 条件的 rLZ-8 晶体形态

Fig. 5 Initial (A) and optimized (B) crystals of the rLZ-8 protein.

2.4 rLZ-8 晶体衍射数据的收集

利用 X-ray 衍射设备收集优化后的蛋白质晶体中各原子的衍射数据 (图 6)。优化数据至 3.2 Å。晶体属于 $P6_422$ 空间群,晶胞参数分别为: $a=b=76.473 \text{ \AA}$, $c=177.476 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ 。通过进一步的晶体优化可以解析蛋白结构 (表 1)。目前正在应用分子置换的方法进行结构解析。

表 1 rLZ-8 蛋白晶体的衍射数据

Table 1 X-ray diffraction data of the rLZ-8 protein

X-ray diffraction data	
Number of reflection (unique / total)	55043 / 92913
Unit cell parameters (Å)	$a=b=76.473$, $c=177.476$ $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$
Space group	$P6_422$
Resolution range (Å)	3.20-50.00
Completeness (%)	99.3 (99.8)
Rmerge (%)	0.071 (0.465)
I / sigma	54.164 (7.543)
Wavelength (Å)	1.54178

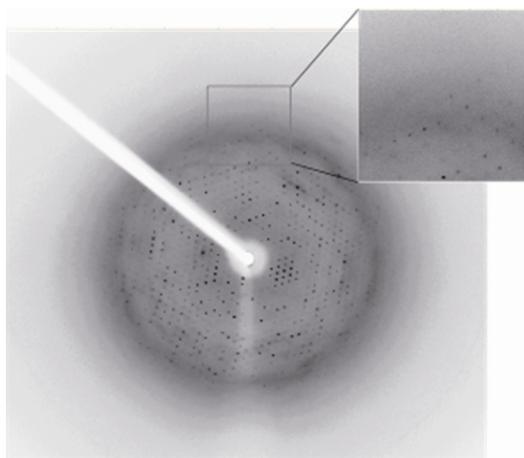


图 6 rLZ-8 蛋白晶体 X 射线衍射图

Fig. 6 Typical diffraction pattern of the rLZ-8 protein.

3 讨论

本文通过原核表达, 获得带有 His-tag 的灵芝免疫调节蛋白 LZ-8, 通过分子筛层析显示为二聚体蛋白, 与天然 LZ-8 蛋白相同, 均为二聚体蛋白。天然的 LZ-8 蛋白不含有 Met、Cys、His^[2,17], 所以它们是由非共价键作用形成二聚体的。由于重组表达的 LZ-8 蛋白中也不含 Cys、Met, 因此重组蛋白也是由非共价键作用而生成的二聚体蛋白。这一结构与已经解析结构的 FIP-fve 一致。LZ-8 与 FIP-fve 在氨基酸序列上相似性很高, 推测 LZ-8 与 FIP-fve 应该有很相似的晶体结构。通过这一结构的进一步解析, 可以解释真菌免疫调节蛋白所具有的免疫调节功能的本质原因。

本研究成功获得了 LZ-8 的蛋白晶体, 并且获得了 3.2 Å 的数据, 通过进一步蛋白晶体优化, 提高晶体各原子相位分辨率, 将对晶体结构的解析提供良好的数据, 为解释以 LZ-8 蛋白为代表的真菌免疫调节蛋白的功能以及对该家族蛋白的应用提供了结构基础。

本研究虽然对 LZ-8 的晶体进行过多次优化, 但是都没有提高分辨率。可能原因是 LZ-8 晶体生长速度太快, 使原子没有时间形成有序排列, 从而造成分辨率不高。进一步晶体优化过程中, 如果能够减慢晶体的生长速度, 将有助于原子形成有序排列, 从而使分辨率提高。

对重组 LZ-8 结构的解析确定, 将有利于对 LZ-8

蛋白开展功能机制的进一步研究。同时, 这种结构研究方法可以应用于中草药的其他蛋白的结构及功能研究, 为我国的中医研究应用提供更多支持。

REFERENCES

- [1] Lin ZB. *Lingzhi: From Mystery to Science*. Beijing: Peking University Medical Press, 2009.
- [2] Kino K, Yamashita A, Yamaoka K, *et al*. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, Ling Zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*. *J Biol Chem*, 1989, **264**(1): 472-478.
- [3] Lin WH, Hung CH, Hsu CI, *et al*. Dimerization of the N-terminal amphipathic alpha-helix domain of the fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* (FIP-gts) defined by a yeast two-hybrid system and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 1997, **272**(32): 20044-20048.
- [4] Ko JL, Hsu CI, Lin RH, *et al*. A new fungal immunomodulatory protein, FIP-fve isolated from the edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence. *Eur J Biochem*, 1995, **228**(2): 244-249.
- [5] Hsu HC, Hsu CI, Lin RH, *et al*. Fip-vvo, a new fungal immunomodulatory protein isolated from *Volvariella volvacea*. *Biochem J*, 1997, **323**: 557-565.
- [6] Sheu F, Chien PJ, Hsieh KY, *et al*. Purification, cloning, and functional characterization of a novel immunomodulatory protein from *Antrodia camphorata* (Bitter Mushroom) that exhibits TLR2-dependent NF-kappaB activation and M1 polarization within murine macrophages. *J Agric Food Chem*, 2009, **57**(10): 4130-4141
- [7] Zhou X, Xie M, Hong F, *et al*. Genomic cloning and characterization of a FIP-gsi gene encoding a fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma sinense*. (Aphyllphoromycetidae). *Int J Med Mushrooms*, 2009, **11**(1): 77-86.
- [8] Kino K, Yamashita A, Yamaoka K, *et al*. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, Ling Zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*. *J Biol Chem*, 1989, **264**(1): 472-478.
- [9] Kino K, Mizumoto K, Sone T, *et al*. An immunomodulating protein, Ling Zhi-8 (LZ-8) prevents insulinitis in non-obese diabetic mice. *Diabetologia*, 1990, **33**(12): 713-718.
- [10] Lin YL, Liang YC, Tseng YS, *et al*. An immunomodulatory

- protein, Ling Zhi-8, induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF-kappaB and MAPK pathways. *J Leukoc Biol*, 2009, **86**(4): 877-889.
- [11] Liang CY, Zhang SQ, Liu ZY, *et al.* Ganoderma lucidum immunomodulatory protein (LZ-8) expressed in *Pichia pastoris* and the identification of immunocompetence. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(3): 441-447.
梁朝阳, 张淑芹, 刘志屹, 等. 灵芝免疫调节蛋白(LZ-8)在毕赤酵母中的表达及其免疫活性鉴定. *生物工程学报*, 2009, **25**(3): 441-447.
- [12] Kino K, Sone T, Watanabe J, *et al.* Immunomodulator, LZ-8, prevents antibody production in mice. *Int J Immunopharmacol*, 1991, **13**(8): 1109-1115.
- [13] Van der Hem LG, Van der Vliet, *et al.* LingZhi-8: studies of a new immunomodulating agent. *Transplantation*, 1995, **60**(5): 438-443.
- [14] Haak-Frendscho M, Kino K, Sone T, *et al.* Ling Zhi-8: a novel T cell mitogen induces cytokine production and upregulation of ICAM-1 expression. *Cell Immunol*, 1993, **150**(1): 101-113.
- [15] Seow SV, Kuo IC, Paaventhana P, *et al.* Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies on the fungal immunomodulatory protein Fve from the golden needle mushroom (*Flammulina velutipes*). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2003, **59**: 1487-1489.
- [16] Paaventhana P, Joseph JS, Seow SV, *et al.* A 1.7Å structure of Fve, a member of the new fungal immunomodulatory protein family. *J Mol Biol*, 2003, **332**(2): 461-470.
- [17] Tanaka S, Ko K, Kino K, *et al.* Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, Ling Zhi-8 (LZ-8). An immunomodulator from a fungus, *Ganoderma lucidum*, having similarity to immunoglobulin variable regions. *J Biol Chem*, 1989, **264**(28): 16372-16377.

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论 (不用单列标题书写)。目的 (Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法 (Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results): 本文最后得出的结果 (实验数据部分)。结论 (Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的 (如DNA、ATP等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。