

· 医药生物技术 ·

# 具核梭杆菌 CarRS 双组分系统组氨酸激酶 CarS 的表达、纯化及生化活性测定

李竺婷<sup>1,2</sup>, 师舷<sup>1,2</sup>, 范若辰<sup>3</sup>, 王路路<sup>3</sup>, 卜婷婷<sup>1,2</sup>, 郑维<sup>1,2\*</sup>, 张旭强<sup>1,2</sup>, 权春善<sup>1,2\*</sup>

1 大连民族大学 生物技术与资源利用教育部重点实验室, 辽宁 大连 116600

2 大连民族大学生命科学院, 辽宁 大连 116600

3 大连理工大学生物工程学院, 辽宁 大连 116081

李竺婷, 师舷, 范若辰, 王路路, 卜婷婷, 郑维, 张旭强, 权春善. 具核梭杆菌 CarRS 双组分系统组氨酸激酶 CarS 的表达、纯化及生化活性测定[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1596-1608.

LI Zhuting, SHI Xian, FAN Ruochen, WANG Lulu, BU Tingting, ZHENG Wei, ZHANG Xuqiang, QUAN Chunshan. Expression, purification, and characterization of the histidine kinase CarS from *Fusobacterium nucleatum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1596-1608.

**摘要:** 具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)是一种条件致病菌,能够在结直肠癌组织中富集,影响结直肠癌发生发展的多个阶段。双组分系统在病原菌耐药性、致病性相关基因的调控和表达中起重要作用。本文以具核梭杆菌 CarRS 双组分系统为研究对象,重点对其组氨酸激酶蛋白 CarS 进行重组表达和性质研究。利用在线软件 SMART、CCTOP 和 AlphaFold2 对 CarS 二级结构和三级结构进行预测,其结果表明 CarS 蛋白具有 2 个跨膜螺旋区,包含 9 个  $\alpha$  螺旋和 12 个  $\beta$  折叠结构;由两个结构域构成,一是位于 N 末端的跨膜域(氨基酸 1-170),另一个是位于 C 末端的胞内域,胞内域由信号接收域(histidine kinases, adenylyl cyclases, methyl-accepting proteins, prokaryotic signaling proteins, HAMP)、磷酸受体结构域(histidine kinase domain, HisKA)和组氨酸激酶催化结构域(histidine kinase-like ATPase catalytic domain, HATPase\_c)组成。由于全长的 CarS 蛋白未能在宿主细胞中表达,因此根据其二级、三级结构特点,构建了 CarS 胞内蛋白的融合表达载体 pET-28a(+)-MBP-TEV-CarS<sub>cyto</sub>,并在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 中进行过表达。经亲和层析、离子交换层析和凝胶过滤层析,最终获得纯度较高的 CarS<sub>cyto</sub>-MBP 蛋白,终浓度达 20 mg/mL。活性实验结果表明,CarS<sub>cyto</sub>-MBP 具有蛋白激酶和磷酸转移酶双活性,麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MBP)标签对 CarS<sub>cyto</sub> 蛋白的生物活性无影响。上述结果为深入解析 CarRS 双组分系统在具核梭杆菌中的生物学功能提供了一定的理论基础。

**关键词:** 具核梭杆菌; CarRS 双组分系统; 蛋白激酶活性; 磷酸转移酶活性

资助项目: 辽宁省自然科学基金民族创新联合基金(2020-MZLH-07)

This work was supported by the Innovation Joint Fund of Natural Science Foundation of Liaoning Province (2020-MZLH-07).

\*Corresponding authors. E-mail: QUAN Chunshan, mikyeken@dlnu.edu.cn; ZHENG Wei, zhengwei@dlnu.edu.cn

Received: 2022-09-28; Accepted: 2023-01-07

# Expression, purification, and characterization of the histidine kinase CarS from *Fusobacterium nucleatum*

LI Zhuting<sup>1,2</sup>, SHI Xian<sup>1,2</sup>, FAN Ruochen<sup>3</sup>, WANG Lulu<sup>3</sup>, BU Tingting<sup>1,2</sup>, ZHENG Wei<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Xuqiang<sup>1,2</sup>, QUAN Chunshan<sup>1,2\*</sup>

1 Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization, Ministry of Education, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning, China

2 School of Life Sciences, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning, China

3 School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116081, Liaoning, China

**Abstract:** *Fusobacterium nucleatum* is an opportunistic pathogenic bacterium that can be enriched in colorectal cancer tissues, affecting multiple stages of colorectal cancer development. The two-component system plays an important role in the regulation and expression of genes related to pathogenic resistance and pathogenicity. In this paper, we focused on the CarRS two-component system of *F. nucleatum*, and the histidine kinase protein CarS was recombinantly expressed and characterized. Several online software such as SMART, CCTOP and AlphaFold2 were used to predict the secondary and tertiary structure of the CarS protein. The results showed that CarS is a membrane protein with two transmembrane helices and contains 9  $\alpha$ -helices and 12  $\beta$ -folds. CarS protein is composed of two domains, one is the N-terminal transmembrane domain (amino acids 1–170), the other is the C-terminal intracellular domain. The latter is composed of a signal receiving domain (histidine kinases, adenylyl cyclases, methyl-accepting proteins, prokaryotic signaling proteins, HAMP), a phosphate receptor domain (histidine kinase domain, HisKA), and a histidine kinase catalytic domain (histidine kinase-like ATPase catalytic domain, HATPase\_c). Since the full-length CarS protein could not be expressed in host cells, a fusion expression vector pET-28a(+)-MBP-TEV-CarS<sub>cyto</sub> was constructed based on the characteristics of secondary and tertiary structures, and overexpressed in *Escherichia coli* BL21-Codonplus(DE3)RIL. CarS<sub>cyto</sub>-MBP protein was purified by affinity chromatography, ion-exchange chromatography, and gel filtration chromatography with a final concentration of 20 mg/ml. CarS<sub>cyto</sub>-MBP protein showed both protein kinase and phosphotransferase activities, and the MBP tag had no effect on the function of CarS<sub>cyto</sub> protein. The above results provide a basis for in-depth analysis of the biological function of the CarRS two-component system in *F. nucleatum*.

**Keywords:** *Fusobacterium nucleatum*; CarRS two-component system; kinase activity; phosphotransferase activity

致病菌在进化过程中,逐渐形成了一系列信号感应和调节网络,可以快速识别人体生态环境的变化,调控病原菌的入侵和定殖策略,突破人体的多重免疫屏障。因此,对致病菌信号通路的研究显得尤为重要。随着基因组学、蛋白质组学

等多种组学技术的快速发展和对基因组序列的深入挖掘,近年在结直肠癌组织中发现了一种“肿瘤细菌”——具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)<sup>[1]</sup>。具核梭杆菌最早发现于口腔中,但最近的大量研究表明具核梭杆菌是结直肠癌

发生和发展的驱动因素或致病因子。具核梭杆菌外膜上的黏附素能够促进肿瘤细胞的增殖与转移,协助肿瘤细胞抵抗抗生素,保护具核梭杆菌及附近的肿瘤细胞不被免疫细胞杀死<sup>[2-3]</sup>。具核梭杆菌可在结直肠癌组织中大量富集,直接影响结直肠癌进展的多个阶段。

双组分系统(two-component system, TCS)存在于大多数病原细菌中,是细菌细胞非常重要的感应外界环境刺激的调控机制,被喻为细菌的“神经系统”。TCS由组氨酸激酶(histidine kinase, HK)和相对应的应答调节蛋白(response regulator, RR)组成。当感受到胞外信号时,组氨酸激酶C端的组氨酸残基(His)发生自磷酸化反应,并将磷酸基团转移到应答调节蛋白位于N端的天冬氨酸残基(Asp)上,磷酸化的RR可与靶基因结合并调控其转录表达。已测序的绝大多数病原细菌基因组中均可找到双组分系统。一种细菌可拥有多个不同类型的双组分系统,其组成与结构随感受的刺激信号和作用的目标基因不同而有所变化。不同细菌所持有的双组分系统数量也有所不同,其数量与基因组大小和所处生态位的多样性有关。比如,铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)编码60对双组分系统;沙门氏菌编码29对双组分系统;金黄色葡萄球菌编码17对双组分系统;肺炎球菌编码13对双组分系统<sup>[4-5]</sup>。

尽管具核梭杆菌与结直肠癌等多种疾病有关,但对该菌双组分系统的分类及生物功能方面的研究较少。Scheible等<sup>[6]</sup>研究报告ModRS双组分系统调控具核梭杆菌氧化应激防御途径中关键酶甲硫氨酸亚砷还原酶(methionine sulfoxide reductase, MsrAB)的表达,从而保护该菌在免疫细胞中免受氧化损伤,并通过附着和侵袭多个靶组织获得毒力。Wu等<sup>[7]</sup>研究报告具核梭杆菌CarRS(car, coaggregation regulator; R, the response regulator; S, the histidine sensor kinase)

双组分系统协同环境中的赖氨酸调节关键共聚集因子RadD的表达,从而促进种间相互作用、毒力和营养获取,帮助具核梭杆菌在口腔生物膜和口腔外部位的不利环境中生存。CarRS双组分系统与条件致病菌铜绿假单胞菌中的CzcRS双组分系统同源性较高,由应答调节因子CarR和组氨酸激酶蛋白CarS两部分组成,其中CarS是具有双功能活性的组氨酸激酶蛋白,是CarRS双组分系统中的“传感器”,能够感知特定的环境刺激,自身磷酸化同时激活应答调节蛋白CarR,进而调控靶基因的表达,产生细胞对信号的响应。

本研究以*F. nucleatum* ATCC 25586为模式菌,构建表达载体pET-28a(+)-CarS,由于CarS蛋白在工程菌中难以表达,因此本文利用SMART、CCTOP、AlphaFold2等软件预测CarS二级结构域和三级结构,针对CarS蛋白的胞内域片段(以下简称为CarS<sub>cyto</sub>)构建携带麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MBP)标签的表达载体pET-28a(+)-MBP-TEV-CarS<sub>cyto</sub>,经过优化标签、宿主细胞、诱导剂浓度等条件,在*E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)RIL中过表达获得大量CarS<sub>cyto</sub>-MBP蛋白。纯化得到的CarS<sub>cyto</sub>-MBP同时具有激酶活性和磷酸转移酶活性,能够发生自身磷酸化,并将磷酸基团传递到应答调节蛋白CarR上。本文通过对组氨酸激酶蛋白CarS的结构及其激酶性质的研究,为深入解析其在CarRS双组分系统中与应答调节因子CarR的相互作用机制,以及CarRS双组分系统在具核梭杆菌中的生物学功能提供了一定的理论基础,有望发现和解决具核梭杆菌对于结直肠癌致病性的关键靶点。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂和仪器

试剂:酵母粉、蛋白胨、琼脂粉、咪唑、乙

二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、SOC、麦芽糖、甘油、甘氨酸、考马斯亮蓝 G-250、冰醋酸、无水乙醇等均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。氯化钠购自天津科密欧化学试剂有限公司。Ni-NTA 购自 GE 公司。卡纳霉素(kanamycin)、氯霉素(chloramphenicol)购自北京索莱宝科技有限公司。高保真预混 HS 酶、FastDigest Dpn I 购自 TaKaRa 公司。

仪器:紫外分光光度计[岛津(上海)实验器材有限公司, UV-2700]; PCR 仪[美谷生物科技(浙江)有限公司]; 电转仪(BTX 公司, AS8); 层析分析系统(GE 公司, AKTA prime plus)。

### 1.1.2 菌株和质粒载体

具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)菌株 ATCC 25586 购自美国模式培养物集存库(ATCC); 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、*E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) RIL、*E. coli* BL21(DE3)pLysS、*E. coli* C43(DE3)和质粒 pET-28a(+)均为本实验室保存。

### 1.1.3 引物设计

本研究中 PCR 扩增所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 序列见表 1。

## 1.2 方法

### 1.2.1 组氨酸激酶蛋白 CarS 的二级、三级结构的预测及分析

将获得的 CarS 的氨基酸序列用 SMART、CCTOP<sup>[8]</sup>、HMMTOP、Octopus<sup>[9]</sup>、Philius<sup>[10]</sup>、Phobius<sup>[11]</sup>、Pro<sup>[12]</sup>、Prodiv<sup>[12]</sup>、ScampiMsa<sup>[13]</sup>、TMHMM 等软件进行分析, 将胞外域、跨膜域以及胞内域的预测结果综合整理分析, 再利用 Protter<sup>[14]</sup>在线软件分析 CarS 蛋白的拓扑结构。

为了能够从分子水平上更加了解蛋白质的作用机制, 本文使用 AlphaFold2<sup>[15]</sup>软件利用从头计算的方法, 在原子精度内获得蛋白质的三维

结构以及生物信息。

### 1.2.2 重组表达载体 pET-28a(+)-CarS 及 pET-28a(+)-MBP-TEV-CarS<sub>cyto</sub> 的构建

根据 *F. nucleatum* ATCC 25586 (AE009951.2) 的 *carS* 基因序列信息, 设计上下游引物, 采用 RF-cloning 法<sup>[16]</sup>构建重组表达载体, 最终将目的基因与载体 pET-28a(+)相连, 电转化转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 并涂布于含有卡纳霉素(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 LB 固体培养基上, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 16 h, 从固体培养基上挑取单菌落至含有卡纳霉素(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 16 h。用质粒抽提试剂盒提取质粒, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司对重组质粒进行测序。

### 1.2.3 CarS、CarS<sub>cyto</sub>-MBP 蛋白的诱导表达与纯化

测序确认目标基因序列后, 利用化学法将重组质粒分别转入 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL、*E. coli* BL21(DE3)pLysS、*E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* C43(DE3)感受态细胞中, 并涂布于含卡纳霉素(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和氯霉素(37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 LB 固体培养基上, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 12 h, 挑取单菌落在含双抗的 LB 液体培养基内, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温摇床中以 180 r/min 的转速培养过夜。

将培养过夜的种子液按照 1% 比例接种于含卡纳霉素(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和氯霉素(37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 LB 液体培养基中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  的条件下培养至  $OD_{600} \approx 0.7$  时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG)诱导蛋白表达, 并将培养条件调整为 30  $^{\circ}\text{C}$ , 培养 8 h 后收集菌体, 用重悬缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl)重悬菌体, 使用超声破碎仪以 35% 的功率破碎菌液, 待菌液变得澄清透明后, 在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 条件下离心 30 min。

表 1 构建表达载体所用引物

Table 1 Oligonucleotides used for the construction of expression vectors

Primers	Sequences (5'→3')
CarS-F	CAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCATGTTCTTAAAGAAGATGAATAGAC
CarS-R	GGAGCTCGAATTCGGATCCGCGTTATATTGGAAATCTTACAATAAAG
CarS <sub>cyto</sub> -F	CGAGGAAAACCTGTACTTCCAATCCAATATTAAAAATGCTTTTAAACCAGTTAAAA
CarS <sub>cyto</sub> -R	GCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCATTATATTGGAAATCTTACAATAAAGCA

The underlined sequences represent homogeneous arms of target genes.

进一步对破碎后的菌液进行亲和层析纯化, 取离心后的上清液转移到镍柱中, 冰浴振荡孵育 30 min, 用 5–8 倍柱体积的洗涤缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl、200 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L DTT)洗涤柱子, 加入 30 mL 的蛋白洗脱缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl、200 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L DTT、10 mmol/L 麦芽糖), 收集目的蛋白。在蛋白洗脱缓冲液中加入 70 mL 离子交换层析缓冲液 QA (20 mmol/L Tris-HCl), 转移至阴离子交换层析柱, 利用 AKTA prime plus 蛋白层析系统对获得的蛋白进行梯度洗脱, 收集出峰位置对应接收管, 用超滤浓缩管对收集到的蛋白进行超滤浓缩, 浓缩至 2 mL 后将蛋白加入到凝胶过滤层析柱, 收集目的蛋白的组分, 用超滤浓缩管对目的蛋白再次超滤浓缩, 待浓缩至 500  $\mu$ L 左右置于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱冻存。

#### 1.2.4 CarS<sub>cyto</sub>-MBP 蛋白磷酸激酶活性的检测

使用 Kinase-Glo Luminescent Kinase Assay Kit 试剂盒检测纯化后蛋白的激酶活性。首先配制 pH 8.0 的磷酸激酶缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>), 设置无 CarS<sub>cyto</sub>-MBP 蛋白的体系作为阴性对照, 用磷酸激酶缓冲液将 CarS<sub>cyto</sub>-MBP 蛋白稀释至不同浓度(2, 4, 6, 8, 10  $\mu$ mol/L), 加入等体积的含 20  $\mu$ mol/L ATP 的磷酸激酶缓冲液, 制备总反应体系为 50  $\mu$ L 的磷酸激酶反应液, 于 37  $^{\circ}$ C 条件下反应 30 min,

在磷酸激酶反应液中加入 50  $\mu$ L 发光试剂, 配制成总体积为 100  $\mu$ L 的反应液, 于 37  $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 移至 96 孔板中, 用多功能酶标仪检测反应液的发光强度。

底物在蛋白激酶的作用下与 ATP 反应, 磷酸化消耗 ATP, 此时在体系中加入甲壳荧光素, 体系中剩余的 ATP 在甲壳荧光素酶的作用下与甲壳荧光素反应生成氧化荧光素, 发出荧光。通过检测体系的荧光强度来判断 ATP 的消耗量, 可得知 CarS<sub>cyto</sub>-MBP 蛋白的激酶活性大小。

#### 1.2.5 CarS<sub>cyto</sub>-MBP 蛋白磷酸转移酶活性的检测

首先配制 pH 8.0 的磷酸激酶缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>), 在 10  $\mu$ mol/L CarS<sub>cyto</sub>-MBP 蛋白中加入等体积的含 20  $\mu$ mol/L ATP 的磷酸激酶缓冲液, 配制成总体积为 400  $\mu$ L 的磷酸激酶反应液, 于 37  $^{\circ}$ C 条件下反应 30 min。用磷酸激酶缓冲液将 CarR 蛋白稀释至不同浓度(5、10、15、20、25  $\mu$ mol/L), 加入等体积的磷酸激酶反应液, 配制成总反应体积为 50  $\mu$ L 的反应液, 于 37  $^{\circ}$ C 条件下反应 10 min。随后加入 50  $\mu$ L 发光试剂, 配制成总体积为 100  $\mu$ L 的反应液, 37  $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 将反应液移至 96 孔板中, 用多功能酶标仪检测反应液的发光强度。

当反应体系中存在 CarR 蛋白, CarS<sub>cyto</sub>-MBP 蛋白的组氨酸残基发生磷酸化消耗 ATP, 随后 CarS<sub>cyto</sub>-MBP 蛋白将磷酸基团转移到 CarR 蛋白的

天冬氨酸残基使其发生磷酸化,该过程会增大 ATP 的消耗量。当反应体系中 CarS<sub>cyto-MBP</sub> 蛋白浓度恒定,改变 CarR 蛋白浓度,通过检测反应体系中剩余 ATP 的含量来判断是否发生磷酸基团的转移,以此检测 CarS<sub>cyto-MBP</sub> 蛋白的磷酸转移酶活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 双组分系统的生物信息学分析

利用生物信息学方法,从 *F. nucleatum* ATCC 25586 全蛋白氨基酸序列中分别筛选出含 HATPase\_c 与 Response\_reg 结构域的蛋白,经分析,得到 4 组 TCS (CarRS, ArlSR, LytSR, ModSR)。结合 NCBI 的序列比对结果,参考京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库,初步预测 *F. nucleatum* ATCC 25586 菌株中 4 对 TCS 的生物学功能,如表 2 所示。

其中,CarRS 双组分系统与铜绿假单胞菌中的 CzcRS 双组分系统同源性较高,而铜绿假单胞菌通过 CzcRS 双组分系统调控毒力因子、生物膜的形成以及对微量金属和碳青霉烯类抗生素的耐药性,初步预测 CarRS 双组分系统在具核梭杆菌中可能具有同样重要的调控作用。

### 2.2 CarS 蛋白二级结构预测及分析

双组分系统的组氨酸激酶一般由 N 端跨膜

结构域和 C 端的胞内域构成,胞内域部分还有二聚化结构域和 ATP 结合结构域。利用 9 种在线软件(CCTOP、HMMTOP、Octopus、Philius、Phobius、Pro、Prodiv、ScampiMsa、TMHMM)预测组氨酸蛋白激酶 CarS 的二级结构,结果表明 CarS 蛋白是一个典型的膜蛋白,具有两个跨膜结构域(图 1A)。由 Protter 软件预测得到 CarS 蛋白的拓扑结构(图 1B)与上述 9 个软件预测得到的结果相一致。CarS 蛋白的 N 末端和 C 末端均位于胞内,N 末端的跨膜结构域(氨基酸 1-170)中含有 2 个跨膜螺旋,位于 2 个跨膜螺旋之间有 1 个分子量较大的胞外环(氨基酸 42-148);C 末端含有一个较大的胞内域(氨基酸 171-445),胞内域中含有信号接收域 HAMP、磷酸受体结构域 HisKA 和组氨酸激酶催化结构域 HATPase\_c (图 1C)。

### 2.3 CarS 蛋白三级结构预测及分析

利用 AlphaFold2 对组氨酸激酶蛋白 CarS 进行了三级结构的预测,结果如图 2A 所示。CarS 蛋白中包括 9 个  $\alpha$  螺旋和 12 个  $\beta$  折叠结构,整体由 2 个结构域构成,一是位于 N 末端的跨膜域(氨基酸 1-170),另一个是位于 C 末端的胞内域(氨基酸 171-445),分别命名为 N-端区域(N-terminal region)和 C-端区域(C-terminal region),三级结构预测结果显示 N-端区域中含有 2 个跨膜螺旋片段( $\alpha_2$  和  $\alpha_3$ ),与二级结构预测结果一致。

表 2 *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 菌株 TCS 的功能预测

Table 2 Prediction of the functions of TCS in *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586

TCS	Amino acids HK/RR	Identities/Similarity HK (%) / RR (%)	Homologous strains	Deduced function
CarS-CarR	445/224	26, 47	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO-1	Metal ion transport, biofilm formation
ArlS-ArlR	427/233	36, 48	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA-39	Autolysis of the bacteria
LytS-LytR	541/240	31, 36	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CO-98	Autolysis of bacteria, biofilm activity
ModS-ModR	552/260	34, 33	<i>Lactobacillus plantarum</i> LPL-1	Against oxidative damage, virulence

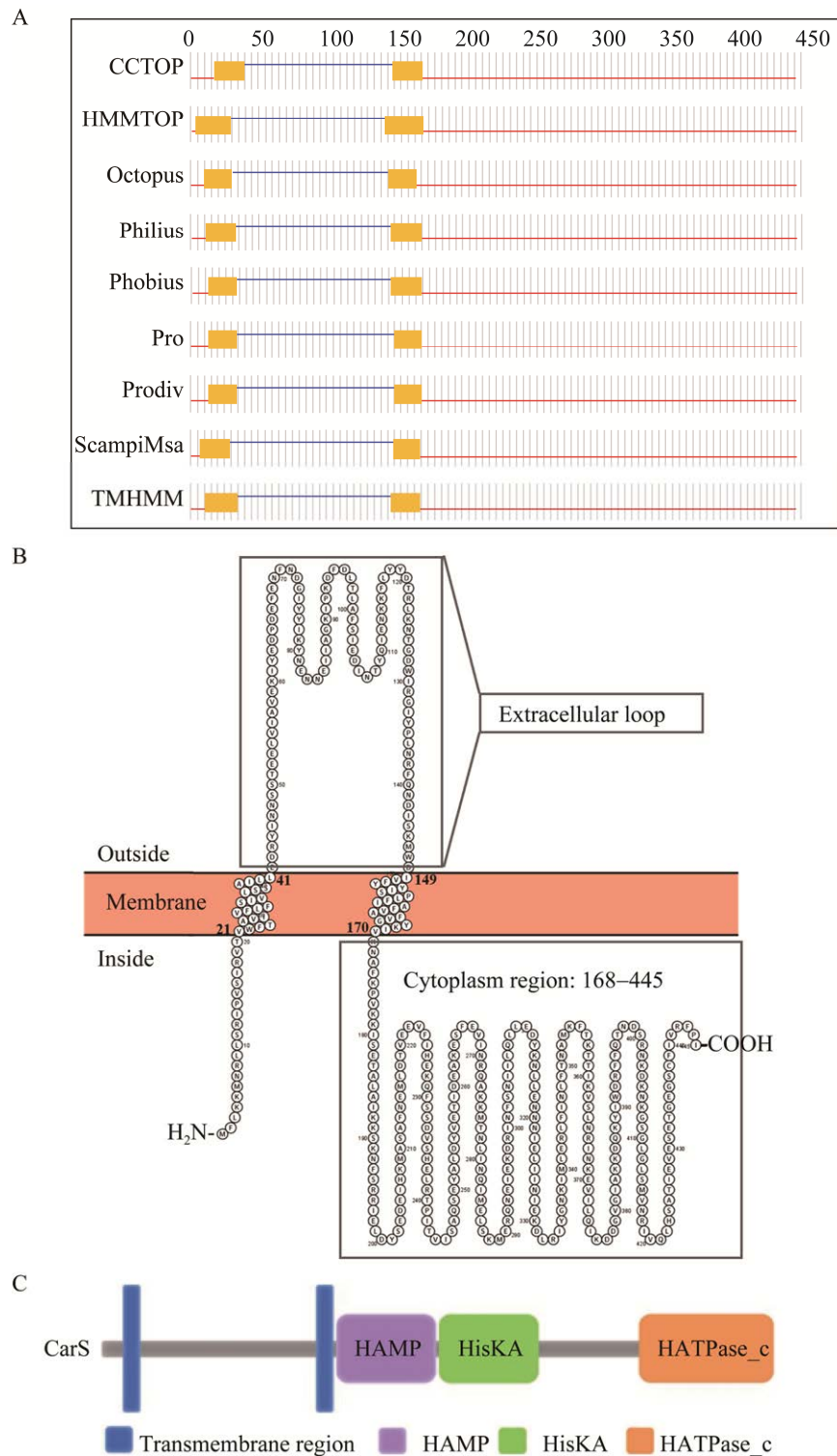


图 1 组氨酸激酶蛋白 CarS 的二级结构示意图

Figure 1 The schematic of the secondary structure of the histidine kinase protein CarS. A: The transmembrane structure of CarS predicted by different online software. B: The topology of CarS predicted by the Protter program. C: The predicted secondary domain of histidine kinase protein CarS.



结合组氨酸激酶蛋白 CarS 及其同源蛋白的序列和结构的特点分析, N-端区域中, 第 1 个和第 2 个跨膜螺旋之间有 1 个较大的胞外域结构(氨基酸 41-149), 命名为胞外传感器结构域(extracellular sensor domain), 该结构域由 5 个  $\beta$ -折叠( $\beta 1-\beta 5$ )构成(图 2B)。胞内域包括 3 个区域, 信号接收域 HAMP(氨基酸 171-225), 磷酸受体结构域 HisKA(氨基酸 226-292), 组氨酸激酶催化结构域 HATPase\_c(氨基酸 336-445)。其中 HAMP 由 2 个  $\alpha$ -螺旋( $\alpha 3-\alpha 4$ )组成, 具有调节同型二聚体受体的磷酸化或甲基化的作用。磷酸受体结构域 HisKA 同样含有 2 个  $\alpha$ -螺旋( $\alpha 4-\alpha 5$ ), 能够接收磷酸基团。组氨酸激酶催化结构域

HATPase\_c 含有 4 个  $\alpha$ -螺旋( $\alpha 6-\alpha 9$ )和 7 个  $\beta$ -折叠( $\beta 6-\beta 12$ ), 该结构域能够与 ATP 结合, 传递磷酸基团(图 2C)。

## 2.4 CarS<sub>cyto</sub> 蛋白的表达与纯化

### 2.4.1 表达载体 pET-28a(+)-CarS 的构建及表达

采用 RF-cloning 法构建了 pET-28a(+)-CarS 载体, 结果如图 3A 所示。将 pET-28a(+)-CarS 载体测序验证后转化至大肠杆菌, 进行蛋白表达。如图 3B 所示, 考察了 *E. coli* C43(DE3)、*E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)RIL、*E. coli* BL21(DE3)pLysS 三种宿主细胞, 但均未在目标蛋白分子量相当处得到蛋白条带。同时, 也对 IPTG 浓度、表达温度、表达温度等因素进行了优化, 但均未得到理想结果。

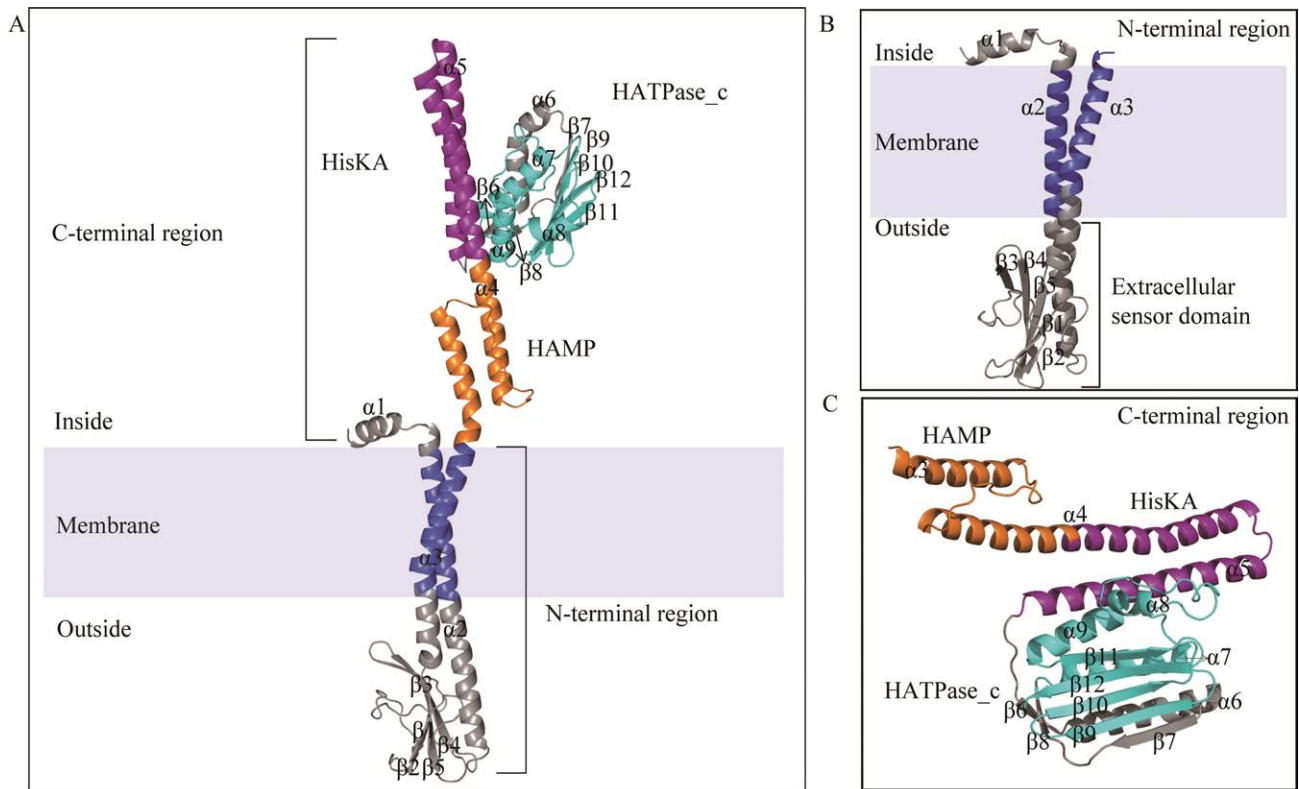


图 2 CarS 蛋白三级结构预测图

Figure 2 The predicted tertiary structure of CarS. A: The overall folding of the CarS molecule is viewed along with the cartoon. The tertiary structure of CarS was predicted by AlphaFold2 protocol, the  $\alpha$ -helices and the  $\beta$ -strands are numbered, and the terminals are labeled. The overall folding of the N-terminal domain (B) and C-terminal domain (C) in CarS.



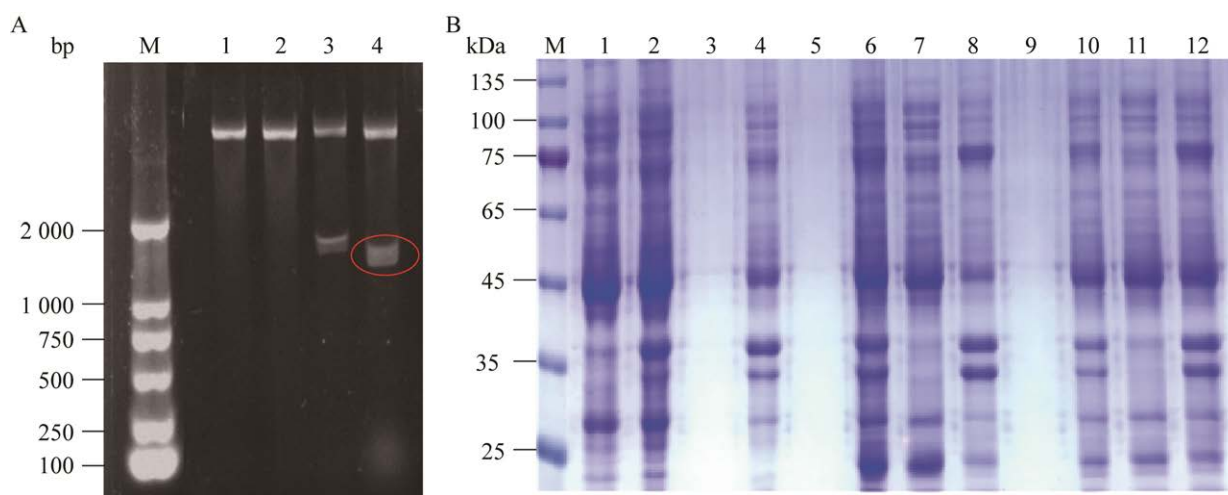


图3 表达载体 pET-28a(+)-CarS 的构建及 CarS 蛋白表达

Figure 3 Construction and expression of plasmid pET-28a(+)-CarS. A: Construction of plasmid pET-28a(+)-CarS. M: DL2000 marker (bp); 1–4: Verification results of double digestion of recombinant plasmids. B: Expression of the CarS protein in different host cells. M: M5 HiClear prestained protein ladder; 1–4: *E. coli* C43(DE3); 5–8: *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL; 9–12: *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

#### 2.4.2 表达载体 pET-28a(+)-MBP-TEV-CarS<sub>cyto</sub> 的构建

MBP 标签可以增加目标蛋白的溶解性从而提高融合蛋白表达量, 并可用 10–20 mmol/L 麦芽糖在温和的条件下洗脱, 得到高纯度、高浓度的目标蛋白。但由于 MBP 标签较大, 可能对蛋白生物活性产生影响, 因此我们将 MBP 标签融合在目标蛋白的 N 端, 构建如图 4A 所示的含有 TEV 酶切位点的 pET-28a(+)-MBP-TEV-CarS<sub>cyto</sub> 载体。采用 RF-cloning 法构建重组质粒 pET-28a(+)-MBP-TEV-CarS<sub>cyto</sub>, 通过 PCR 扩增进一步验证, 如图 4B 泳道 2 所示, 目的条带大小符合要求。重组质粒经测序和序列比对分析, 证明 pET-28a(+)-MBP-TEV-CarS<sub>cyto</sub> 载体构建成功。

#### 2.4.3 CarS<sub>cyto-MBP</sub> 蛋白的表达与纯化

将构建成功的 pET-28a(+)-MBP-TEV-CarS<sub>cyto</sub> 重组质粒通过化学转化法转至 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)RIL 感受态细胞中, IPTG 诱导表达, 破碎菌体, 上清液利用 MBP 填料进行亲

和层析, 利用 SDS-PAGE 进行检测, 结果如图 4C 所示。在分子量为 75 kDa 处得到一条比较清晰的蛋白条带, 大小与理论值相符。采用阴离子交换层析法对亲和层析后的 CarS<sub>cyto-MBP</sub> 蛋白样品进行进一步纯化, 结果如图 4D 所示。峰相对应蛋白样品的 SDS-PAGE 检测结果表明, 样品蛋白分子量与 CarS<sub>cyto-MBP</sub> 蛋白相符。收集出峰位置相对应的蛋白, 浓缩, 上样至凝胶过滤层析柱, 结果如图 4E。在洗脱时间为 44 min 处得到一个洗脱峰, 经 SDS-PAGE 检测蛋白分子量与 CarS<sub>cyto-MBP</sub> 蛋白相符, 收集该峰位置对应的蛋白, 最终得到的蛋白浓度约 20 mg/mL。

#### 2.5 CarS<sub>cyto-MBP</sub> 蛋白磷酸激酶活性的检测

利用 Kinase-Glo Luminescent Kinase Assay Kit 试剂盒测定 CarS<sub>cyto-MBP</sub> 的磷酸激酶活性。由图 5 可知, 在 50 mL 反应体系中, 随着 CarS<sub>cyto-MBP</sub> 蛋白浓度的增加(2–10 μmol/L), 发光值逐渐减小, 表明 ATP 消耗量相应增大, 证明 CarS<sub>cyto-MBP</sub> 蛋白具有激酶活性。

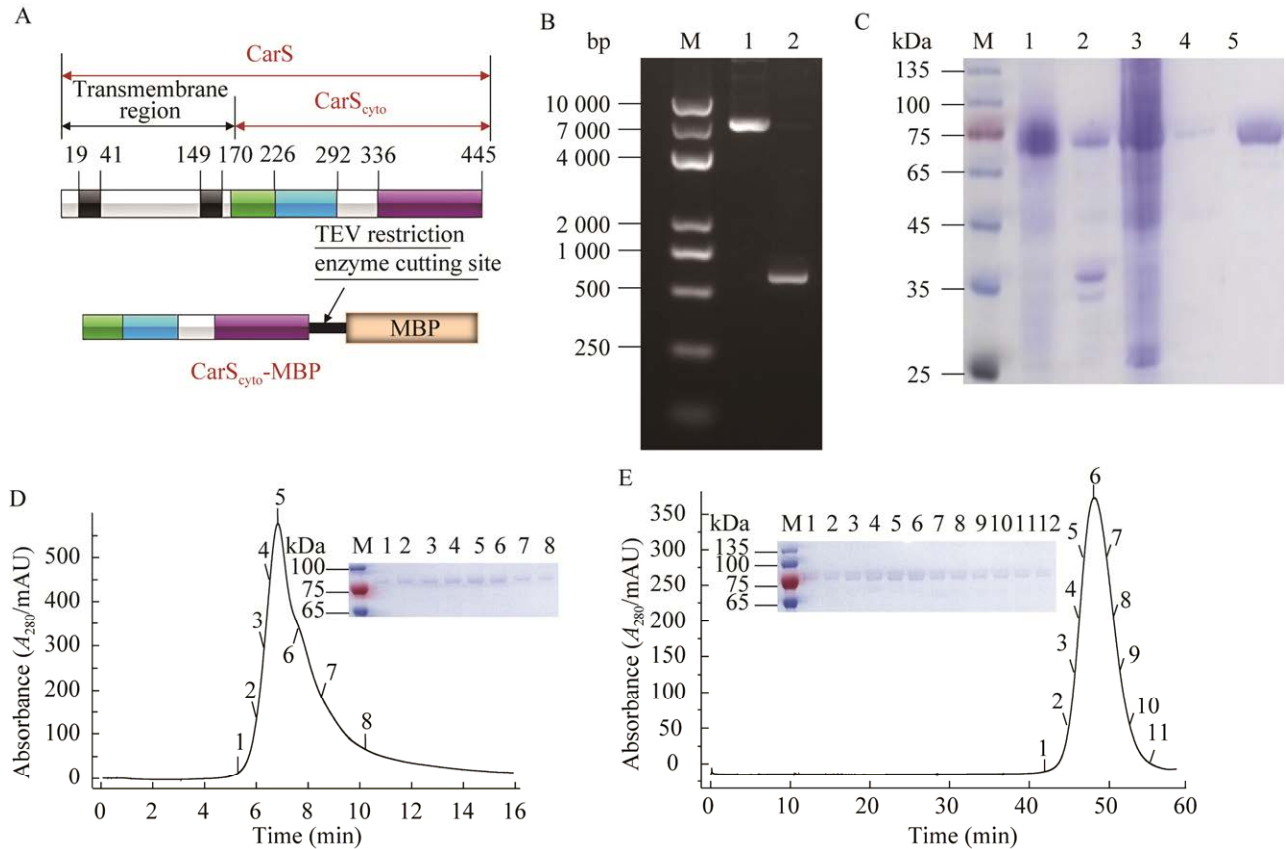


图 4 表达载体 pET-28a(+)-MBP-TEV-CarS<sub>cyto</sub> 的构建及 CarS<sub>cyto</sub>-MBP 蛋白纯化

Figure 4 Construction of plasmid pET-28a(+)-MBP-TEV-CarS<sub>cyto</sub> and the purification of CarS<sub>cyto</sub>-MBP protein. A: Schematic representation of the secondary structure of the CarS<sub>cyto</sub>-MBP containing the enzyme resection site. B: Construction of plasmid pET-28a(+)-MBP-TEV-CarS<sub>cyto</sub>. M: DL 10000 DNA marker (bp); 1: pET28-MBP-TEV-CarS<sub>cyto</sub>; 2: The results of PCR validation of recombinant plasmids. C: SDS-PAGE of CarS<sub>cyto</sub>-MBP. M: M5 HiClear prestained protein ladder; 1: Supernatant centrifuged after sonication; 2: Centrifugal sediment after ultrasonic disruption; 3: Penetrate buffer; 4: Washing buffer; 5: Elution buffer. D: Ion-exchange chromatography of CarS<sub>cyto</sub>-MBP. M: M5 HiClear prestained protein ladder; 1–8: Corresponding to the fraction of tubes 20–33 on the chromatogram. E: Gel filtration chromatography of CarS<sub>cyto</sub>-MBP. M: M5 HiClear prestained protein ladder; 1–12: Corresponding to the fraction of tubes 60–73 on the chromatogram.

## 2.6 CarS<sub>cyto</sub>-MBP 蛋白磷酸转移酶活性的检测

由于双组分系统是以磷酸基团传递的形式来完成信号的传递,通过上述激酶活性实验已验证 CarS<sub>cyto</sub>-MBP 蛋白具有激酶活性。当激酶反应液体系中加入 CarR 蛋白, CarS<sub>cyto</sub>-MBP 蛋白发生自磷酸化后将磷酸基团转移到 CarR 蛋白的天冬氨酸残基上,该过程会增大 ATP 的消耗量,

因此可通过检测反应液的发光值变化来间接判断 CarS<sub>cyto</sub>-MBP 蛋白是否具有磷酸转移酶活性。由图 6 可知,在 CarS<sub>cyto</sub>-MBP 蛋白浓度恒定为 5 μmol/L 时,向激酶反应液中加入不同浓度的 CarR 蛋白(5–25 μmol/L),则随着 CarR 蛋白浓度的增加,发光值逐渐减小,ATP 消耗量增大,证明 CarS<sub>cyto</sub>-MBP 蛋白具有磷酸转移酶活性。

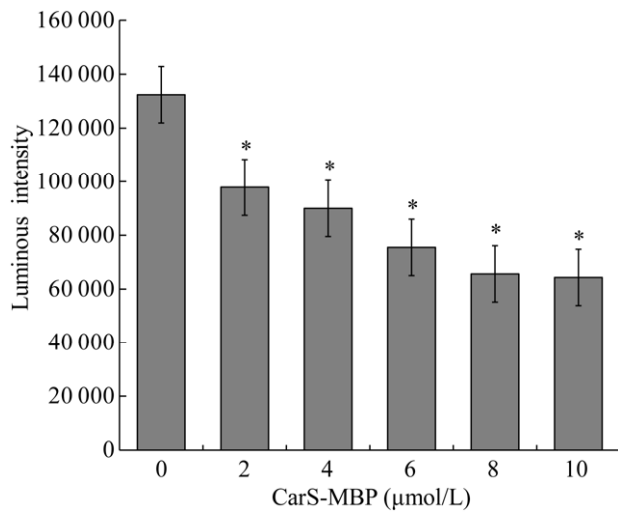


图5 CarS<sub>cyto-MBP</sub>蛋白激酶活性检测  
Figure 5 Detection of the protein kinase activity of CarS<sub>cyto-MBP</sub>. \*:  $P < 0.5$ .

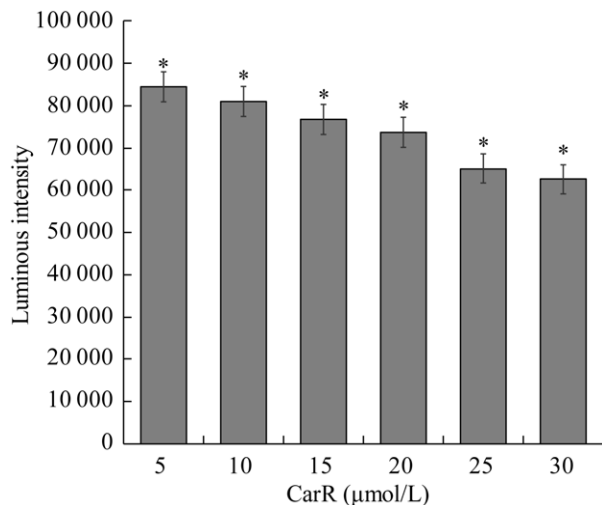


图6 CarS<sub>cyto-MBP</sub>蛋白磷酸转移酶活性检测  
Figure 6 Detection of the protein phosphotransferase activity of CarS<sub>cyto-MBP</sub>. \*:  $P < 0.5$ .

### 3 讨论与结论

双组分系统是细菌用来检测和响应不断变化的环境条件和压力的重要调控机制,在感知外部或内部刺激时,关键组氨酸激酶蛋白被磷酸化使细菌能够调节相关基因的表达并以特定、快速的方式适应其生理环境。大多数致病菌利用双组分系统进行种间相互作用、毒力和营养获取<sup>[17]</sup>。

该系统由组氨酸激酶蛋白和应答调节蛋白组成,组氨酸激酶蛋白和应答调节蛋白有各自高度保守的结构域 HATPase\_c 和 Response\_reg。为更好地挖掘和理解具核梭杆菌双组分系统与毒力因子之间的相互调控关系,实验前期,利用生物信息学方法对 *F. nucleatum* ATCC 25586 的双组分系统进行分析,确定该菌含有 4 个成对的 TCS (CarRS, ArlSR, LytSR, ModSR), 其中, CarRS 可能参与调控细菌内重金属离子浓度, ArlSR 可能涉及菌体自溶, LytSR 可能涉及菌体自溶与生物膜的活性, ModSR 可能涉及碳水化合物的利用调节<sup>[18]</sup>。通过序列比对分析,发现 *F. nucleatum* ATCC 25586 双组分系统 CarRS 与铜绿假单胞菌双组分系统 CzcRS 有较高同源性,而 CzcRS 与该菌毒力因子的表达和耐药性调控密切相关。铜绿假单胞菌 CzcRS 双组分系统应答调节蛋白 CzcR 被组氨酸激酶 CzcS 磷酸化后,诱导表达 CzcCBA 外排泵蛋白,使细菌在一定程度上增强对  $Zn^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  等重金属离子的抗性<sup>[19]</sup>,降低重金属离子对细菌造成的危害。CzcR 还可以直接调控 Las 系统,通过调控 *rhlI*、*rhlR* 和 *lasR* 三个基因来合成重要毒力因子绿脓菌素,并调控群体感应系统<sup>[20]</sup>。此外, CzcR 负调控 *oprD* 基因,抑制能外排碳青霉烯类抗生素的孔蛋白的表达<sup>[21]</sup>,从而使铜绿假单胞菌具有耐药性。组氨酸激酶蛋白 CarS 二级、三级结构的预测结果表明, CarS 蛋白结构中含有两段跨膜结构,而跨膜区的存在增加了 CarS 蛋白表达的难度。为获得全长的 CarS 蛋白,本文利用 RF-cloning 法构建了 pET-28a(+)-CarS 载体,并依次优化宿主细胞、诱导条件、表达温度等参数,但在上清和沉淀中均未检测出 CarS 蛋白。因此,构建了带有 MBP 标签的胞内域可溶性蛋白表达载体 pET-28a(+)-MBP-TEV-CarS<sub>cyto</sub>, 并在 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)RIL 宿主细胞中成功表达

CarS<sub>cyto-MBP</sub> 蛋白。实验设计时采用含 MBP 的填料进行蛋白纯化,以标签蛋白形式存在的麦芽糖结合蛋白可以减少目的蛋白的降解,提高表达产物的水溶性,同时为目的蛋白的纯化提供了基础<sup>[22]</sup>。亲和层析时在洗涤缓冲液和蛋白洗脱缓冲液中加入了 EDTA,能够减少 ATPase 的污染,使融合蛋白与其他蛋白成分分离<sup>[23]</sup>。随后又通过离子交换层析和凝胶过滤层析对蛋白做进一步纯化,利用不同蛋白之间的差异,将目的蛋白与分子量大小及理化性质接近的蛋白区分开来,进一步提高融合蛋白的纯度<sup>[24]</sup>。实验采用 Kinase-Glo Luminescent Kinase Assay Kit 试剂盒检测激酶反应后溶液中 ATP 的剩余含量,以此来定量地检测激酶活性。实验结果表明,融合蛋白 CarS<sub>cyto-MBP</sub> 中的 MBP 标签对 CarS<sub>cyto</sub> 蛋白的生物学功能没有产生影响,具有磷酸激酶活性与磷酸转移酶活性。文章所选用的试剂盒是由萤光素酶(Ultra-Glo™ Luciferase)和特定的缓冲液组成,能够减少 ATPase 或其他来自化合物的自发荧光的干扰<sup>[25]</sup>。

本文成功表达并纯化得到具有生物活性的 CarS<sub>cyto</sub> 融合蛋白,未来可以通过分子对接以及动力学模拟评估 CarS<sub>cyto</sub> 蛋白结构中起到关键作用的氨基酸,将关键部位氨基酸进行定点突变从而验证关键氨基酸起到的重要作用。本研究为后续深入解析 CarRS 双组分系统的生物学功能,探究其与毒力因子之间的关系,以及在具核梭杆菌致病过程中所起的作用提供了一定的前期研究基础。

## REFERENCES

- [1] 毛旭虎, 童亚楠. 具核梭杆菌研究进展[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(19): 1867-1872.  
MAO XH, TONG YN. Progress in *Fusobacterium nucleatum*[J]. Journal of Third Military Medical University, 2019, 41(19): 1867-1872 (in Chinese).
- [2] ABED J, EMGÅRD JE, ZAMIR G, FAROJA M, ALMOGY G, GRENOV A, Sol A, NAOR R, PIKARSKY E, ATLAN KA, MELLUL A, CHAUSHU S, MANSON AL, EARL AM, OU N, BRENNAN CA, GARRETT WS, BACHRACH G. Fap2 mediates *Fusobacterium nucleatum* colorectal adenocarcinoma enrichment by binding to tumor-expressed gal-GalNAc[J]. Cell Host & Microbe, 2016, 20(2): 215-225.
- [3] GUR C, IBRAHIM Y, ISAACSON B, YAMIN R, ABED J, GAMLIEL M, ENK J, BAR-ON Y, STANIETSKY-KAYNAN N, COPPENHAGEN-GLAZER S, SHUSSMAN N, ALMOGY G, CUAPIO A, HOFER E, MEVORACH D, TABIB A, ORTENBERG R, MARKEL G, MIKLIĆ K, JONJIC S, et al. Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack[J]. Immunity, 2015, 42(2): 344-355.
- [4] WANG BX, CADY KC, OYARCE GC, RIBBECK K, LAUB MT. Two-component signaling systems regulate diverse virulence-associated traits in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(11): e03089-e03020.
- [5] de PINA LC, da SILVA FSH, GALVÃO TC, PAUER H, FERREIRA RBR, ANTUNES LCM. The role of two-component regulatory systems in environmental sensing and virulence in *Salmonella*[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2021, 47(4): 397-434.
- [6] SCHEIBLE M, NGUYEN CT, LUONG TT, LEE JH, CHEN YW, CHANG C, WITTCHEN M, CAMACHO MI, TINER BL, WU CG, TAUCH A, DAS A, TON-THAT H. The fused methionine sulfoxide reductase MsrAB promotes oxidative stress defense and bacterial virulence in *Fusobacterium nucleatum*[J]. mBio, 2022, 13(3): e0302221.
- [7] WU CG, CHEN YW, SCHEIBLE M, CHANG C, WITTCHEN M, LEE JH, LUONG TT, TINER BL, TAUCH A, DAS A, TON-THAT H. Genetic and molecular determinants of polymicrobial interactions in *Fusobacterium nucleatum*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(23): e2006482118.
- [8] DOBSON L, REMÉNYI I, TUSNÁDY GE. CCTOP: a consensus constrained TOPology prediction web server[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(W1): W408-W412.
- [9] VIKLUND H, ELOFSSON A. OCTOPUS: improving topology prediction by two-track ANN-based preference scores and an extended topological grammar[J]. Bioinformatics, 2008, 24(15): 1662-1668.

- [10] REYNOLDS SM, KÄLL L, RIFFLE ME, BILMES JA, NOBLE WS. Transmembrane topology and signal peptide prediction using dynamic Bayesian networks[J]. *PLoS Computational Biology*, 2008, 4(11): e1000213.
- [11] KÄLL L, KROGH A, SONNHAMMER ELL. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction: the Phobius web server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(Web Server issue): W429-W432.
- [12] VIKLUND H, ELOFSSON A. Best alpha-helical transmembrane protein topology predictions are achieved using hidden Markov models and evolutionary information[J]. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 2004, 13(7): 1908-1917.
- [13] PETERS C, TSIRIGOS KD, SHU NJ, ELOFSSON A. Improved topology prediction using the terminal hydrophobic helices rule[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(8): 1158-1162.
- [14] OMASITS U, AHRENS CH, MÜLLER S, WOLLSCHIED B. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data[J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2014, 30(6): 884-886.
- [15] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, GREEN T, FIGURNOV M, RONNEBERGER O, TUNYASUVUNAKOOL K, BATES R, ŽÍDEK A, POTAPENKO A, BRIDGLAND A, MEYER C, KOHL SAA, BALLARD AJ, COWIE A, ROMERA-PAREDES B, NIKOLOV S, JAIN R, ADLER J, BACK T, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 583-589.
- [16] 陆路, 熊文, 张钰琨, 王丽娜, 权春善, 范圣第. RF克隆结合巢式PCR构建金黄色葡萄球菌组氨酸蛋白激酶 AgrC 表达载体[J]. *中国生物工程杂志*, 2014, 34(10): 55-60.
- LU L, XIONG W, ZHANG YK, WANG LN, QUAN CS, FAN SD. Expression vector construction of *Staphylococcus aureus* histidine kinase AgrC based on RF cloning combined with nested PCR[J]. *China Biotechnology*, 2014, 34(10): 55-60 (in Chinese).
- [17] SCHAEFERS MM. Regulation of virulence by two-component systems in pathogenic *Burkholderia*[J]. *Infection and Immunity*, 2020, 88(7): e00927-19.
- [18] 单世平, 郭照辉, 张德元, 刘清术, 程伟, 黄军, 魏小武, 王玉双, 伍善东, 付祖姣. 贪铜菌 6-5 双组分信号系统 czcR2-czcS2 的克隆和生物信息学分析[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(36): 148-154.
- SHAN SP, GUO ZH, ZHANG DY, LIU QS, CHENG W, HUANG J, WEI XW, WANG YS, WU SD, FU ZJ. Gene cloning and bioinformatics analysis of two-component signal systems czcR2-czcS2 from *Cupriavidus* 6-5[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(36): 148-154 (in Chinese).
- [19] 李群, 杨洪江, 林书祥, 王维, 叶羽洁. 铜绿假单胞菌重金属离子耐受性调查及相关机制的研究[J]. *生物技术通报*, 2013(6): 160-166.
- LI Q, YANG HJ, LIN SX, WANG W, YE YJ. Heavy metal resistance and its related mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013(6): 160-166 (in Chinese).
- [20] DIEPPOIS G, DUCRET V, CAILLE O, PERRON K. The transcriptional regulator CzcR modulates antibiotic resistance and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e38148.
- [21] 陈瑞, 唐英春, 朱家馨, 吴本权, 谈淑卿. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制: 耐药株外膜蛋白 OprD<sub>2</sub> 缺失[J]. *中国抗感染化疗杂志*, 2001, 1(4): 229-230.
- CHEN R, TANG YC, ZHU JX, WU BQ, TAN SQ. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa*'s resistance to carbapenem antibiotics-deletion of outer membrane protein OprD<sub>2</sub> of resistant strains[J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2001, 1(4): 229-230 (in Chinese).
- [22] LI Y, LIN Y, JIANG Y, MEHWISH HM, RAJOKA MSR, ZHAO L. Expression and characterization of heparinase II with MBP tag from a novel strain, *Raoultella* NX-TZ-3-15[J]. *Archives of Microbiology*, 2022, 204(9): 551.
- [23] MISHRA V. Affinity tags for protein purification[J]. *Current Protein & Peptide Science*. 2020, 21(8): 821-830.
- [24] RIGI G, GHAEDMOHAMMADI S, AHMADIAN G. A comprehensive review on *Staphylococcal* protein A (SpA): its production and applications[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2019, 66(3):454-464.
- [25] KASHEM MA, NELSON RM, YINGLING JD, PULLEN SS, PROKOPOWICZ, III AS, JONES JW, WOLAK JP, ROGERS GR, MORELOCK MM, SNOW RJ, HOMON CA, JAKES S. Three mechanistically distinct kinase assays compared: measurement of intrinsic ATPase activity identified the most comprehensive set of ITK inhibitors[J]. *Journal of Biomolecular Screening*. 2007, 12 (1): 70-83.

(本文责编 陈宏宇)