



## FtsZ (236–245)区域的两性螺旋特性对大肠埃希氏菌 FtsZ 组装和功能的影响

马青素<sup>1,2#</sup>, 张慧娟<sup>1#</sup>, 郑晓伟<sup>1</sup>, 霍雨佳<sup>1</sup>, 卢锋<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 河南大学医学院抗体药物河南省工程实验室, 河南 开封 475001

<sup>2</sup> 河南省濮阳市人民医院, 河南 濮阳 457000

**摘要:**【目的】探索大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) FtsZ (236–245)结构域两性螺旋特性对 FtsZ 组装和 FtsZ-FtsA 相互作用的影响。【方法】利用分子克隆和定点突变技术, 构建 FtsZ 及其突变体表达载体, 亲和纯化获得相应目标蛋白; 通过同源重组和 P1 转导构建 QN23–QN29 菌株; 利用活细胞成像观察 FtsZ 及其突变体的胞内定位特点; 膜蛋白分离和 Western blot 分析 FtsZ 突变体的膜结合特性变化; 非变性胶分离和体外聚合分析检测定点突变对 FtsZ 单体组装特性的影响; 免疫沉淀和 Far Western blot 实验检测 FtsZ/FtsZ\*-FtsA 间的相互作用。【结果】FtsZ<sup>E237A/K</sup>和 FtsZ<sup>E241A/K</sup>突变体的功能活性降低、各突变体在 *E. coli* 内不能正确定位和形成功能性 Z 环; E237A/K 和 E241A/K 位点突变致各突变体聚合能力降低、FtsZ\*-FtsA 的相互作用减弱和 FtsZ 的膜结合特性变化。【结论】E237 和 E241 是影响 FtsZ (236–245) 区域两性螺旋特性和 FtsZ 组装及 FtsZ-FtsA 相互作用的重要氨基酸。

**关键词:** 大肠埃希氏菌(*E. coli*), FtsZ 突变体(FtsZ\*), FtsA, 两性螺旋

在大肠埃希氏菌, 细胞分裂是细菌生物学最重要且较少理解的问题之一。由于参与该过程的基因主要通过条件突变、在非允许温度条件下致菌体呈长丝状发现的, 所以称此类基因为 *fts* (filamentous temperature-sensitive)基因<sup>[1]</sup>。到目前为止, 已知 *fts* 基因编码的蛋白至少有 14 种(如 FtsZ、FtsA、FtsL、FtsI、FtsN、FtsK、FtsQ、FtsW 和 FtsB 等)<sup>[2–5]</sup> 这些蛋白以 FtsZ 所形成的 Z 环为骨架结构,

通过蛋白与蛋白的相互作用网, 参与 Z 环的组装和稳定, 进而调控细菌细胞的分裂和菌体的形态。

FtsZ 为细菌分裂所必需的蛋白, 是微管蛋白的原核类似物, 在多种致病菌中高度保守。当 FtsZ 单体结构异常, 往往会影响其进一步组装成功能性 Z 环和对细菌分裂的调控, 导致菌体异常分裂或细菌死亡。在菌体内, FtsZ 单体通过纵向和横向相互作用组装成结构复杂的复合体, 这一过程

\*通信作者。Tel/Fax : +86-10-23880398 ; E-mail : lufeng@henu.edu.cn

#并列第一作者。

收稿日期: 2016-07-22 ; 修回日期: 2016-12-26 ; 网络出版日期: 2017-01-19

受 FtsA、zipA、FtsI 和 FtsN 等多种蛋白的调节<sup>[6-8]</sup>，但关于 FtsZ 单体是如何组装成功能性 Z 环、单体内哪些关键氨基酸决定着 FtsZ 的结构与功能和菌体内哪些蛋白参与和/或调控 Z 环的组装和稳定等，皆未完全清楚，而对于相关分子机制的揭示对以 FtsZ 为靶点进行新一代抗生素研发具有指导意义。

近年来，人们对影响 FtsZ 结构和功能的重要氨基酸研究多集中在 FtsZ 单体的纵向接触面(即内表面，interface)，这与该区域是 FtsZ 结合 GTP 及发挥其 GTPase 功能的结构域有关。Monahan LG 等发现，FtsZ 单体组装成原丝(protofilament)后，通过侧面相互作用而进行的横向组装，是 FtsZ 能在即将分裂的菌体中部形成分裂体即功能性 Z 环的重要基础<sup>[9-11]</sup>，但具体机制及涉及到侧面组装的关键氨基酸未明确；Loose 等观察到，在细菌分裂的最后阶段，FtsA 与 FtsZ 共定位于位于细菌中部的分裂体，而且 FtsA-FtsZ 的相互作用是多种致病菌正确分裂所必需的<sup>[12]</sup>。本文通过对 *E. coli* FtsZ 的三维结构进一步分析，发现 FtsZ (236-245)结构域位于 FtsZ 单体的侧面，且具有两性螺旋特性；Stricker J 等将同一结构域中的 245 位丝氨酸(S)突变为苯丙氨酸(F)时，致 *E. coli* 生长缓慢，菌体呈长丝状；活细胞成像显示 FtsZ 单体不能正确组装成功能性的 Z 环，而是沿菌体内膜呈点状分布<sup>[13]</sup>。那么与 S245 处于两性螺旋同一极性面的 E241 和 E237 是否影响 FtsZ 组装和功能呢？本研究通过定点突变及相关分析，拟初步探索 E241 和 E237 对 FtsZ 功能和组装及 FtsZ-FtsA 相互作用的影响及分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

T4 DNA 连接酶、ES-Tag DNA 聚合酶和限制

性核酸内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司；DNA 凝胶回收试剂盒(DP209-02)和质粒小提试剂盒(DP103-02)购自 TIANGEN 公司；抗 FtsZ 抗体(AS10715)为美国 Agrisera 产品，抗 His-tag 抗体(66005-1-Ig)、抗 flag-tag 抗体(20543-1-AP)和二抗-HRP(羊抗兔 SA00001-2、羊抗鼠 SA00001-1)为 Proteintech 产品；细菌基因组 DNA 提取试剂盒(CW0552)和抗 GFP 标签抗体(CW0087)购自北京康为世纪，IPTG 和 L(+)-arabinose 为 Sigma 产品；蛋白亲和纯化柱(HisTrap HP, 17-5247-01)为 GE 公司产品；基因定点突变试剂盒(Cat#200518)为美国 Stratagene 产品；免疫共沉淀试剂盒(cat#46147)为 Thermo 产品。

### 1.2 菌株、质粒和载体

*Escherichia coli* MC1000 (*F-araD139Δ(araABC-leu)7679 galU galKΔ(lac)X74 rpsL thi*)、BL21 和 DH5α，载体 pMLB1113 和 pET30a(+) (Invitrogen)，质粒 pKD3、pKD119 和 pFL11 由实验室保存<sup>[7-9]</sup>(表 1)。

### 1.3 质粒构建

根据定点突变原理，分别设计 FtsZ E237A、E237D、E237K、E241A、E241D 和 E241K 定点突变引物，然后以 pFL11 (*P<sub>lac-yfp</sub>::ftsZ*)质粒 DNA 为模板，按试剂盒(Cat#200518)操作手册对目的基因进行定点突变，所得突变体表达质粒分别为 pQN13 (*P<sub>lac-yfp</sub>::ftsZ<sup>E237A</sup>*)、pQN14 (*P<sub>lac-yfp</sub>::ftsZ<sup>E237D</sup>*)、pQN15 (*P<sub>lac-yfp</sub>::ftsZ<sup>E237K</sup>*)、pQN16 (*P<sub>lac-yfp</sub>::ftsZ<sup>E241A</sup>*)、pQN17 (*P<sub>lac-yfp</sub>::ftsZ<sup>E241D</sup>*)和 pQN18 (*P<sub>lac-yfp</sub>::ftsZ<sup>E241K</sup>*)。

以 pQN13-pQN18 质粒 DNA 为模板，使用 pET30a(+)载体，分别构建 FtsZ 各突变体原核表达质粒 pQN24 (*P<sub>lac-ftsZ<sup>E237A</sup>::his<sub>6</sub></sub>*)、pQN25 (*P<sub>lac-ftsZ<sup>E237D</sup>::his<sub>6</sub></sub>*)、pQN26 (*P<sub>lac-ftsZ<sup>E237K</sup>::his<sub>6</sub></sub>*)、pQN27 (*P<sub>lac-ftsZ<sup>E241A</sup>::his<sub>6</sub></sub>*)、pQN28 (*P<sub>lac-ftsZ<sup>E241D</sup>::his<sub>6</sub></sub>*)和 pQN29 (*P<sub>lac-ftsZ<sup>E241K</sup>::his<sub>6</sub></sub>*)；以 *E. coli* MC1000 基因组 DNA 为模板，利用分子

表 1. 研究中所使用的菌种和质粒  
Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Genotype and/or features	Resistance	Source
MC1000	<i>F<sup>-</sup>Δ (araA-leu)7697, [ara139]<sub>B/r</sub>Δ (codB-lacI)3, galk16, galE15 (GalS), λ<sup>-</sup>, e14<sup>-</sup>, relA1, rpsL150 (strR), spoT1, mcrB1</i>	-	[14]
pMLB1113	Low copy number vector (18 per cell)	Ampicillin	[14]
pKD119	Red recombinase expression plasmid	Tetracycline	[15]
pKD3	Cat marker for gene deletion constructs	Chloramphenicol	[15]
pFL11	<i>P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ</i>	Ampicillin	[16]
pQN13	<i>P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237A</sup></i>	Ampicillin	This study
pQN14	<i>P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237D</sup></i>	Ampicillin	This study
pQN15	<i>P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237K</sup></i>	Ampicillin	This study
pQN16	<i>P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241A</sup></i>	Ampicillin	This study
pQN17	<i>P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241D</sup></i>	Ampicillin	This study
pQN18	<i>P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241K</sup></i>	Ampicillin	This study
pQN21	<i>P<sub>lac</sub>-ftsA::his<sub>6</sub></i>	Ampicillin	This study
pFL15	<i>P<sub>lac</sub>-ftsZ::his<sub>6</sub></i>	Ampicillin	[16]
FL37/pFL11	MC1000/pFL11 ( <i>ΔftsZ-Cat/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ</i> )	Chloramphenicol	[16]
pQN24	<i>P<sub>lac</sub>-ftsZ<sup>E237A</sup>::his<sub>6</sub></i>	Ampicillin	This study
pQN25	<i>P<sub>lac</sub>-ftsZ<sup>E237D</sup>::his<sub>6</sub></i>	Ampicillin	This study
pQN26	<i>P<sub>lac</sub>-ftsZ<sup>E237K</sup>::his<sub>6</sub></i>	Ampicillin	This study
pQN27	<i>P<sub>lac</sub>-ftsZ<sup>E241A</sup>::his<sub>6</sub></i>	Ampicillin	This study
pQN28	<i>P<sub>lac</sub>-ftsZ<sup>E241D</sup>::his<sub>6</sub></i>	Ampicillin	This study
pQN29	<i>P<sub>lac</sub>-ftsZ<sup>E241K</sup>::his<sub>6</sub></i>	Ampicillin	This study
QN19	<i>MC1000:mreB::his<sub>6</sub>-Cat</i>	Chloramphenicol	This study
QN20	<i>MC1000:mreB::his<sub>6</sub></i>	-	This study
QN21	<i>QN20:ftsA::flag-Cat</i>	Chloramphenicol	This study
QN22	<i>MC1000:mreB::his<sub>6</sub>, ftsA::flag</i>	-	This study
QN23	<i>QN22:ΔftsZ-Cat /P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ</i>	Chloramphenicol, Ampicillin	This study
QN24	<i>QN22: ΔftsZ-Cat /P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237A</sup></i>	Chloramphenicol, Ampicillin	This study
QN25	<i>QN22: ΔftsZ-Cat /P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237D</sup></i>	Chloramphenicol, Ampicillin	This study
QN26	<i>QN22: ΔftsZ-Cat /P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237K</sup></i>	Chloramphenicol, Ampicillin	This study
QN27	<i>QN22: ΔftsZ-Cat /P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241A</sup></i>	Chloramphenicol, Ampicillin	This study
QN28	<i>QN22: ΔftsZ-Cat /P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241D</sup></i>	Chloramphenicol, Ampicillin	This study
QN29	<i>QN22: ΔftsZ-Cat /P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241K</sup></i>	Chloramphenicol, Ampicillin	This study

克隆技术, 常规构建 C 端带 His 标签的 FtsA 融合表达质粒 pQN21 (*P<sub>lac</sub>-ftsA::his<sub>6</sub>*)。上述构建的所有质粒皆通过测序证明。

#### 1.4 菌株构建

根据文献[14]报道的方法, 以大肠埃希氏菌 MC1000 为受体菌, 利用同源重组技术分别构建

QN18 (*MC1000:mreB::his<sub>6</sub>-cat*)、QN19 (*MC1000:mreB::his<sub>6</sub>*)和 QN20 (*MC1000: ftsA::flag-cat*)菌株; 以 QN19 为受体菌, 通过 P1 转导技术构建 QN21 (*MC1000:mreB::his<sub>6</sub>, ftsA::flag-cat*), 再使用 pCP20 质粒, 通过重组去除抗生素抗性基因, 获得 QN22 (*MC1000: mreB::his<sub>6</sub>, ftsA::flag*)菌株; 以 QN22 为

受体菌、FL37/pFL11 (*AftsZ-Cat/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ*)为供体(donor)菌(提供 *ftsZ* 基因敲除盒子: *AftsZ-Cat*)<sup>[15]</sup>, 通过 P1 转导分别获得 QN23-QN29 菌株(详细信息见表 1)。为了便于表述, 文中将 *E. coli* 表型 *mreB::his<sub>6</sub>, ftsA::flag, AftsZ-Cat* 设为 QN。

### 1.5 荧光显微镜观察 FtsZ 及其突变体的细胞内定位

根据前期的实验方法<sup>[11,16-17]</sup>, 从 LB 琼脂平板上分别挑取相应菌株新鲜的单菌落, 常规接种于 5 mL LB 中(包含相应的抗生素, 10 μmol/L IPTG), 30 °C 摇菌。当  $OD_{600} \approx 0.8$  左右时, 取 10 μL 新鲜菌液滴于载玻片上并盖上盖玻片。荧光显微镜下观察 YFP::FtsZ/FtsZ\* 在细胞内的定位特点(物镜×100, 目镜×10)。

### 1.6 FtsZ 及其突变体的功能检测

QN23-QN29 菌 37 °C 过夜培养, 次日测  $OD_{600}$  后用相同培养基稀释到  $OD_{600} \approx 0.05$ , 在 5 mL 的培养体系中重新活化至  $OD_{600} \approx 0.5$ 。系列稀释( $10^{-1}$ – $10^{-5}$ ) 各组菌液, 每组样品每个稀释度取 1.2 μL 接种于 LB 琼脂板上(含 30 μg/mL Cat, 100 μg/mL Amp, 20 μmol/L IPTG), 37 °C 培养 24 h。细菌生长曲线的绘制从  $OD_{600} \approx 0.05$  开始, 第 1 个检测点为活化后 1.5 h, 以后每间隔 1 h 取样测 1 次菌液  $OD_{600}$ 。

### 1.7 E. coli 膜蛋白分离

QN23-QN29 菌的培养条件和细菌的收集与免疫共沉淀相同。500 mL 菌液离心所得的菌体沉淀反复冻融 3 次后, 用预冷的 15 mL 20%蔗糖溶液[使用 HE 缓冲液(10 mmol/L Hepes pH 7.4, 5 mmol/L EDTA)配制]悬浮, 使用超声破碎仪破碎细胞 3 次, 每次 20 s。细胞膜组份分离采用两步蔗糖梯度离心法<sup>[18]</sup>, 所得的 SG0 (包含所有细胞膜) 组份用 HE 缓冲液洗涤 1 次, 超速离心(130000×g,

30 min)后的沉淀用 400 μL TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.5)悬浮, 加入 100 μL 的 20% SDS 溶液后充分混匀; 100 °C 煮 5 min, 离心(12000×g, 2 min), 所得样品–20 °C 冻存, 供 Western blot 分析。

### 1.8 蛋白表达和纯化

分别用 pQN24 (*P<sub>lac</sub>-ftsZ<sup>E237A</sup>::his<sub>6</sub>*)、pQN25 (*P<sub>lac</sub>-ftsZ<sup>E237D</sup>::his<sub>6</sub>*)、pQN26 (*P<sub>lac</sub>-ftsZ<sup>E237K</sup>::his<sub>6</sub>*)、pQN27 (*P<sub>lac</sub>-ftsZ<sup>E241A</sup>::his<sub>6</sub>*)、pQN28 (*P<sub>lac</sub>-ftsZ<sup>E241D</sup>::his<sub>6</sub>*)、pQN29 (*P<sub>lac</sub>-ftsZ<sup>E241K</sup>::his<sub>6</sub>*)和 pQN21 (*P<sub>lac</sub>-ftsA::his<sub>6</sub>*) 质粒转化 BL21(DE3)并诱导表达目标蛋白。具体纯化过程参照文献[19]方法进行。使用 LB 培养基、0.2 mmol/L IPTG、30 °C 条件下诱导培养 4.5 h, 离心收菌(4696×g, 10 min); 在 50 mmol/L Tris (pH 7.9)缓冲液中冻融 2 次后超声破碎菌体细胞; 超速离心(23480×g, 30 min, 4 °C)得上清液, 使用 HisTrap HP 柱亲和纯化靶蛋白并定量。

### 1.9 免疫共沉淀分析

QN23-QN29 菌细胞裂解液的制备参照前期工作<sup>[17,20]</sup>。用 5–10 mL 的 Buffer A [10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 0.5% Tween-20, 5% glycerol, 1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF]溶解蛋白沉淀并加入适当体积的 cocktail (50×), 定量其浓度后分装, –80 °C 保存。免疫共沉淀分析过程按试剂盒说明书(cat<sup>#</sup>46147, Thermo)和文献[15]报道进行。每个反应管使用 10 μg 抗-Yfp 抗体(CW0087, 康为世纪)、800 μg 菌体总蛋白和 25 μL protein A/G plus agarose beads, Co-IP 蛋白洗脱液体积为 50 μL。

### 1.10 Western blot 和 Far Western blot 分析

Far Western blot 按文献[21–22]进行。使用纯化的 FtsA-his<sub>6</sub> 蛋白作为诱饵蛋白, 2–3 μg 该蛋白

与适当体积的 2% SDS 上样缓冲液混合, 100 °C 煮沸 4 min, 离心。常规进行 SDS-PAGE 电泳和转膜。为使 Far Western blot 分析膜上的蛋白复性, 使用 TEN50 buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl) 将膜在 4 °C 条件下孵育 72 h, 然后用含 5% 脱脂奶粉的 HHB buffer (20 mmol/L HEPES, pH 7.7, 75 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L DTT, 0.05% Triton X-100) 室温下封闭膜 1 h。用手术刀沿各泳道边缘将封闭后的 NC 膜切成等宽的长条, 分别与 1 mg 的各细菌裂解蛋白(在含有 1% 脱脂奶粉的 HHB buffer 中) 4 °C 过夜孵育; 使用丽春红染色的转印膜作为对照。Western blot 具体分析参考文献[17]。抗-FtsZ、抗-His、抗-Flag、抗-YFP 和羊抗兔二抗的稀释度分别为 1:1000、1:1000、1:1500、1:2000 和 1:20000, 显色方法为 ECL (P1020, 北京普利莱)。

### 1.11 FtsZ 及其突变体的体外聚合分析

用聚合 buffer (50 mmol/L Mes, pH 6.5, 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>) 将 FtsZ 或其突变体纯化蛋白稀释到 6 μmol/L, 30 °C 孵育 3 min 后加入 GTP 至终浓度 1 mmol/L。轻轻混匀后室温静置 20 min, 超速离心(100000×g, 10 min), 然后分别取相同体积的上清(Supernatant, S)和沉淀(Pellet, P)进行 Western blot 分析。另外取等体积室温静置 20 min 的上述液体进行非变性胶凝胶电泳, 转膜后使用抗-FtsZ 抗体进行 Western blot 分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 FtsZ (236–245)区域的两性螺旋特性对 FtsZ 功能的影响

由于 FtsZ 是 *E. coli* 等细菌分裂所必需的蛋

白, 我们使用 3D-JIGSAM 软件对 FtsZ 的三维结构进行分析发现, FtsZ (236–245)结构域具有两性螺旋特性, 且位于 FtsZ 单体的外侧, 进一步分析观察到 E237、E241 位点氨基酸位于 FtsZ (236–245)结构域同一性面(图 1-A、B), 推测 E237、E241 可能是影响 FtsZ 功能的重要氨基酸。我们采用定点突变技术, 将 E237 和 E241 分别突变为丙氨酸(A)、天冬氨酸(D)和赖氨酸(K)后, 通过平板补偿实验和生长曲线分析发现 FtsZ<sup>E237A/K</sup> 和 FtsZ<sup>E241A/K</sup> 突变体的功能明显降低(图 1-C、D), 而 FtsZ<sup>E237D</sup> 和 FtsZ<sup>E241D</sup> 突变体功能活性变化较小, 显示 FtsZ (236–245)结构域两性螺旋特性对 FtsZ 功能的重要性。

### 2.2 E237 和 E241 是影响 FtsZ 在 *E. coli* 中形成 Z 环的重要氨基酸

将 E237 和 E241 突变为性质不同的氨基酸为何影响 FtsZ 功能? 推测各位点突变可能影响 FtsZ 单体在菌体内的组装。我们通过活细胞成像观察到, FtsZ<sup>E237D</sup> 和 FtsZ<sup>E241D</sup> 突变体与野生型 FtsZ 相似, 其单体可在菌体内部组装成功能性的 Z 环; FtsZ<sup>E237A</sup>、FtsZ<sup>E237K</sup>、FtsZ<sup>E241A</sup> 和 FtsZ<sup>E241K</sup> 突变体细胞内定位模式发生明显的改变, 皆未见规则的 Z 环(图 2-B、D、E 和 G); FtsZ<sup>E237A</sup>、FtsZ<sup>E237K</sup> 和 FtsZ<sup>E241K</sup> 表现为横跨细胞两极的螺旋状, FtsZ<sup>E241A</sup> 突变体为膜周边定位模式; 另外显示 FtsZ<sup>E237A</sup>、FtsZ<sup>E237K</sup>、FtsZ<sup>E241A</sup> 和 FtsZ<sup>E241K</sup> 突变体致细胞的形态成长丝状。表明这些突变体因不能正确组装成功能性 Z 环, 一定程度上抑制 *E. coli* 的分裂。研究中为了排除 FtsZ (wt) 和其突变体(FtsZ<sup>\*</sup>)的表达水平可能对 FtsZ/FtsZ<sup>\*</sup> 定位的影响, 我们通过 Western blot 分析观察到质粒表达的 FtsZ/FtsZ<sup>\*</sup> 与 MC1000 内源性 FtsZ (wt) 的水平大致相同(图 2-H)。

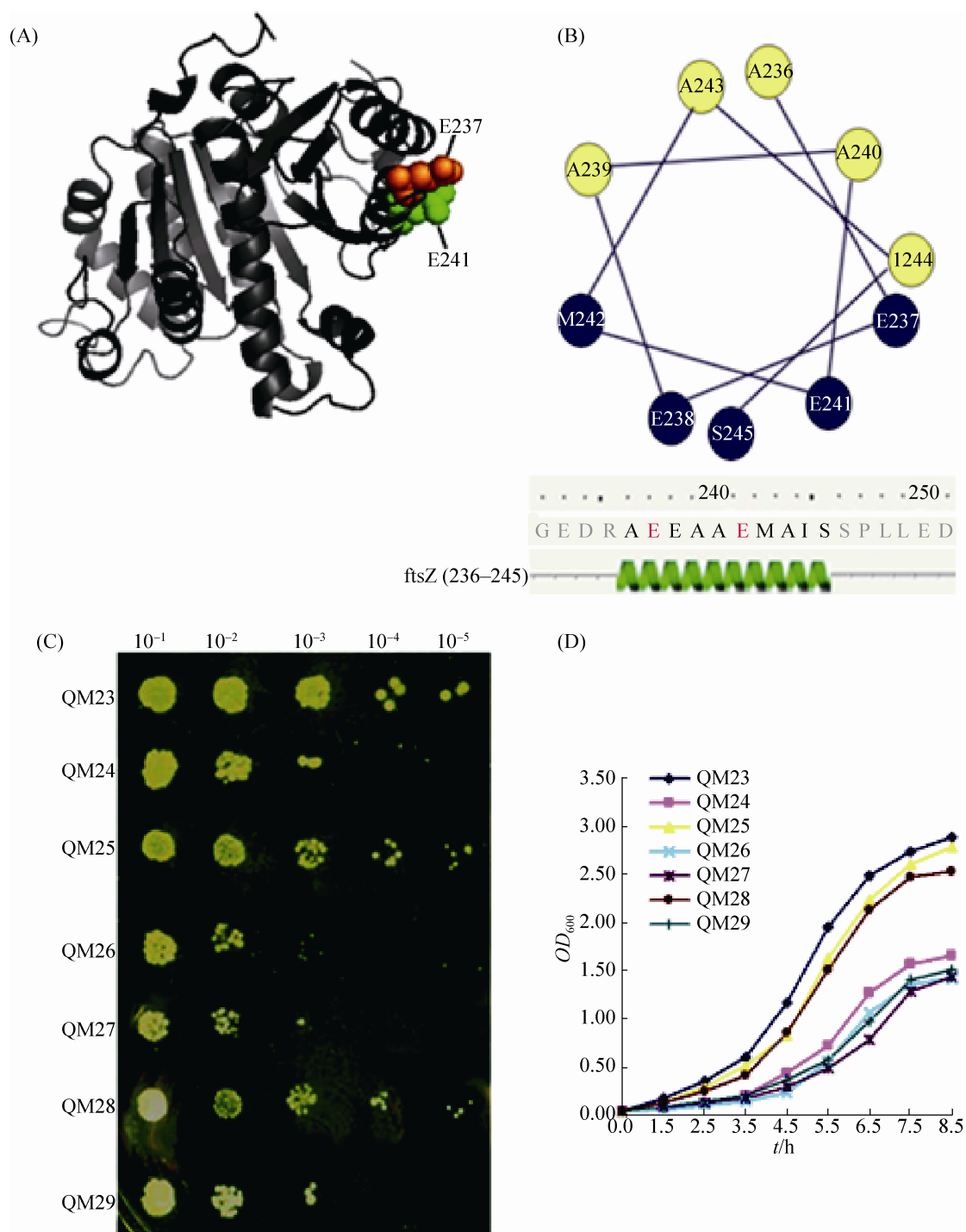


图 1. FtsZ (236–245)区域的两性螺旋特性对 FtsZ 功能影响的分析

Figure 1. Effect of amphipathic helix characteristics of *Escherichia coli* FtsZ (236–245) domain on FtsZ function. A: 3D structure prediction of FtsZ; B: helical wheel projection of FtsZ (236–245) domain; C: plate complement assays; D: growth-curve analysis. MC1000, *E. coli* (wt); QN23: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ*; QN24: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237A</sup>*; QN25: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237D</sup>*; QN26: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237K</sup>*; QN27: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241A</sup>*; QN28: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241D</sup>*; QN29: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241K</sup>*; QN: *mreB::his<sub>6</sub>, ftsA::flag, ΔftsZ-Cat*.

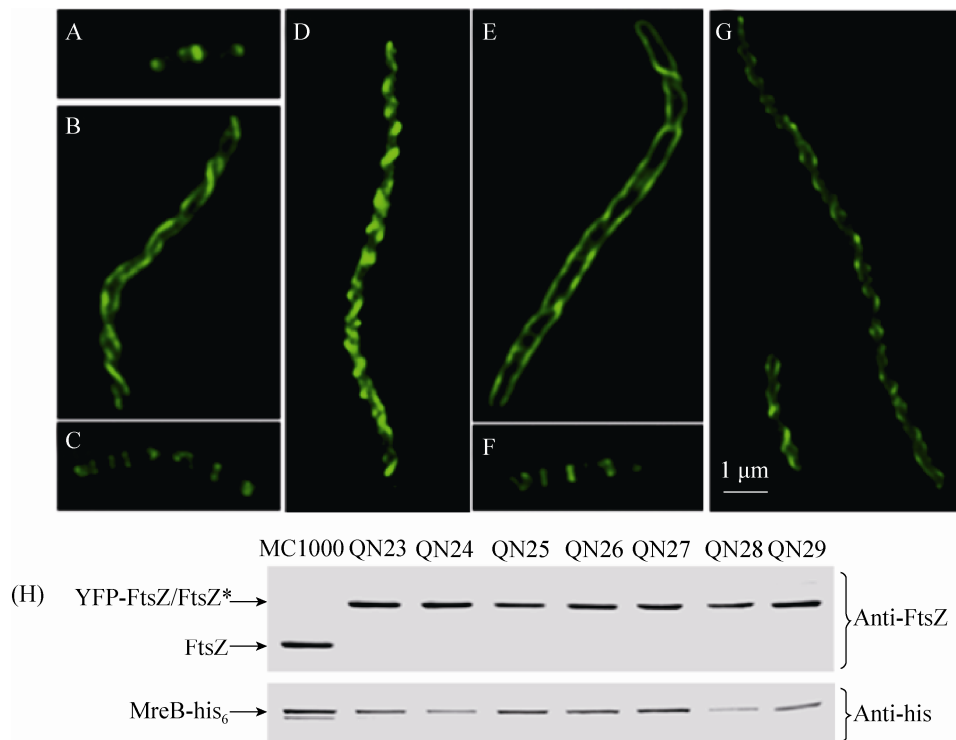


图 2. YFP::FtsZ 及其突变体在 *E. coli* 中的荧光定位(A–G)和表达水平分析(H)

Figure 2. Analysis of fluorescence localization patterns (A–G) and expression levels (H) of YFP::FtsZ and its point mutants. A: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ*; B: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237A</sup>*; C: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237D</sup>*; D: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237K</sup>*; E: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241A</sup>*; F: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241D</sup>*; G: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241K</sup>*; QN: *mreB::his<sub>6</sub>,ftsA::flag,ΔftsZ-Cat*.

### 2.3 FtsZ (236–245)结构域两性螺旋特性是 FtsZ 与细胞膜相互作用的重要基础

轮状图分析发现, FtsZ (236–245)结构域可形成两性螺旋, 活细胞成像显示 FtsZ<sup>E237A</sup> 和 FtsZ<sup>E241A</sup> 突变体有较明显的膜周边定位特点。为进一步证实分析推测和实验结果, 我们通过两步蔗糖梯度离心法分离 QN23–QN29 菌细胞膜蛋白, 并使用已知膜结合蛋白 MreB 作内参对照。Western blot 分析发现, 与野生型 FtsZ 相比较, FtsZ<sup>E237A</sup> 和 FtsZ<sup>E241A</sup> 突变体的膜结合特性明显增加, FtsZ<sup>E237K</sup> 和 FtsZ<sup>E241K</sup> 突变体膜结合能力降低(图 3-A), 通过辉度扫描进行定量分析显示差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )(图 3-B), 提示将 E237 和 E241 突变为性质不同的氨基酸, 可改变 FtsZ (236–245)区域的两性螺旋特性, 进而影响 FtsZ 与细胞膜的相互作用。

### 2.4 E237 和 E241 位点氨基酸性质改变, 影响 FtsZ 单体间相互作用

为了进一步探索 FtsZ<sup>E237A</sup>、FtsZ<sup>E237K</sup>、FtsZ<sup>E241A</sup> 和 FtsZ<sup>E241K</sup> 突变体所引起的 FtsZ 功能和定位模式改变的机制, 我们首先构建了 C 端带 his 标签的 FtsZ 及其突变体融合表达质粒 pFL15 (*P<sub>lac</sub>-ftsZ::his<sub>6</sub>*)、pQN24 (*P<sub>lac</sub>-ftsZ<sup>E237A</sup>::his<sub>6</sub>*)、pQN25 (*P<sub>lac</sub>-ftsZ<sup>E237D</sup>::his<sub>6</sub>*)、pQN26 (*P<sub>lac</sub>-ftsZ<sup>E237K</sup>::his<sub>6</sub>*)、pQN27 (*P<sub>lac</sub>-ftsZ<sup>E241A</sup>::his<sub>6</sub>*)、pQN28 (*P<sub>lac</sub>-ftsZ<sup>E241D</sup>::his<sub>6</sub>*)和 pQN29 (*P<sub>lac</sub>-ftsZ<sup>E241K</sup>::his<sub>6</sub>*), 亲和纯化得到相应的蛋白并定量其浓度。SDS-PAGE 电泳分离及考染观察, FtsZ 及其定点突变体蛋白的纯度较高(图 4-A), Western blot 分析也进一步证明相应蛋白的正确性(图 4-B)。那么 FtsZ 各定点突变体的聚合特性是否发生改变? 我们用聚合缓冲液将纯化的 FtsZ/FtsZ\*蛋白稀释到 6 μmol/L, 加入

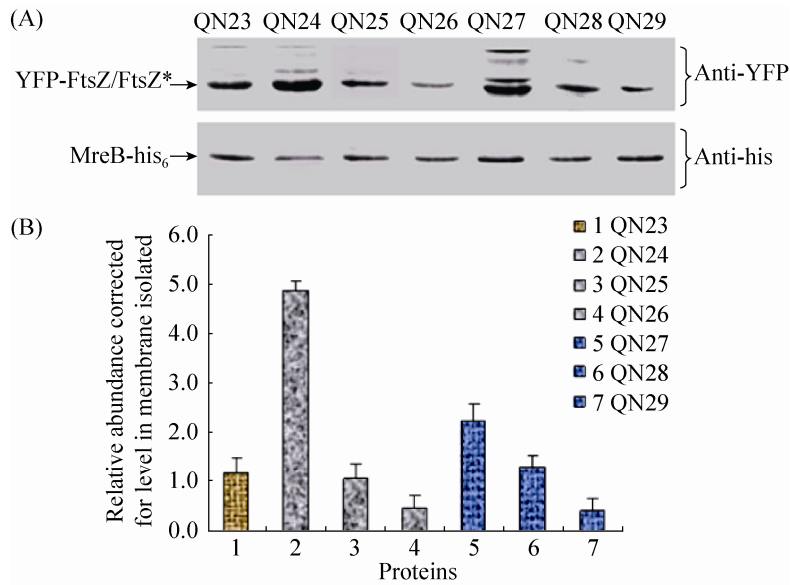


图 3. *FtsZ* (wt)及其突变体 *FtsZ*<sup>E237A</sup>、*FtsZ*<sup>E237D</sup>、*FtsZ*<sup>E237K</sup>、*FtsZ*<sup>E241A</sup>、*FtsZ*<sup>E241D</sup>、*FtsZ*<sup>E241K</sup> 的膜结合特性分析  
Figure 3. The membrane association analysis of *FtsZ* (wt) and its mutants *FtsZ*<sup>E237A</sup>, *FtsZ*<sup>E237D</sup>, *FtsZ*<sup>E237K</sup>, *FtsZ*<sup>E241A</sup>, *FtsZ*<sup>E241D</sup> and *FtsZ*<sup>E241K</sup>. A: Western blot; B: densitometric analysis of immunoblots. QN23: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ*; QN24: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237A</sup>*; QN25: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237D</sup>*; QN26: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237K</sup>*; QN27: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241A</sup>*; QN28: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241D</sup>*; QN29: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241K</sup>*; QN: *mreB::his<sub>6</sub>,ftsA::flag,ΔftsZ-Cat*.

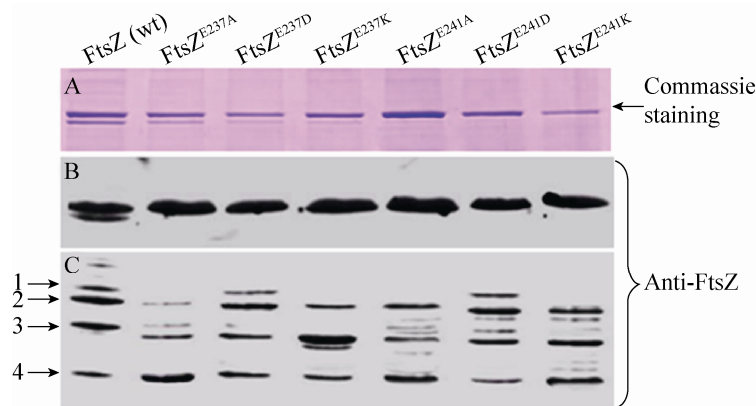


图 4. 表达纯化的 *FtsZ* (wt)及其突变体蛋白电泳分离和 Western blot 分析

Figure 4. Separation of the purified *FtsZ* (wt) and its mutants protein on SDS-PAGE/native PAGE and Western blot analysis. A: Coomassie staining; B: Western blot analysis after separated on SDS-PAGE; C: Western blot analysis after separated on native PAGE; 1–4: Different molecular weight polymerization of *FtsZ*/*FtsZ*\*.

GTP 至终浓度 1 mmol/L 混匀后室温静止 20 min。分别取相同体积的混合液进行非变性凝胶电泳分离和 Western blot 分析,结果显示:野生型 *FtsZ* 与 *FtsZ*<sup>E237D</sup> 和 *FtsZ*<sup>E241D</sup> 突变体主条带非常相似,但 *FtsZ*<sup>E237A</sup>、*FtsZ*<sup>E237K</sup>、*FtsZ*<sup>E241A</sup> 和 *FtsZ*<sup>E241K</sup> 突变

体与野生型 *FtsZ* 明显不同,所有 4 个突变体 Western blot 结果皆未显示 *FtsZ* 最大分子量的聚合体(如条带 1),而且中等分子量大小的聚合体明显减少(如条带 2),分子量最小的聚合体较野生型 *FtsZ* 显著增加(图 4-C 条带 4),提示 E237 和 E241



突变为极性不同的氨基酸,可改变单体的聚合特性,尤其是进一步聚合成较大分子的聚合体特性。

为了验证 E237A、E237K、E241A 和 E241K 位点突变所引起的单体聚合特性的变化,我们将纯化的 FtsZ (wt)和 FtsZ<sup>E237A</sup>、FtsZ<sup>E237D</sup>、FtsZ<sup>E237K</sup>、FtsZ<sup>E241A</sup>、FtsZ<sup>E241D</sup>、FtsZ<sup>E241K</sup> 蛋白室温聚合反应 20 min 后超速离心(100000×g, 10 min),分别取相同体积的上清(Supernatant, S)和沉淀(Pellet, P)进行 Western blot 分析,显示结果与非变性胶分析结果一致。聚合反应 20 min 后,野生型 FtsZ 和 FtsZ<sup>E237D</sup> 及 FtsZ<sup>E241D</sup> 突变体蛋白大部分可形成聚合体存在于离心沉淀中, FtsZ<sup>E237A</sup>、FtsZ<sup>E237K</sup>、

FtsZ<sup>E241A</sup> 和 FtsZ<sup>E241K</sup> 突变体只有小部分发生集合(图 5)。

### 2.5 E237 和 E241 是影响 FtsZ-FtsA 相互作用的重要氨基酸

以 YFP::FtsZ/FtsZ\*为靶分子,使用抗 Yfp 抗体和免疫共沉淀试剂盒(cat#46147, Thermo)进行分析发现,将 E237 和 E241 突变为性质不同的氨基酸后,与 YFP::FtsZ-FtsA 相互作用相比较, YFP::FtsZ<sup>E237A</sup>、YFP::FtsZ<sup>E237K</sup>、YFP::FtsZ<sup>E241A</sup> 和 YFP::FtsZ<sup>E241K</sup> 突变体与 FtsA 相互作用明显减弱, YFP::FtsZ<sup>E237D</sup> 和 YFP::FtsZ<sup>E241D</sup> 突变体与 FtsA 相互作用基本没有变化(图 6)。

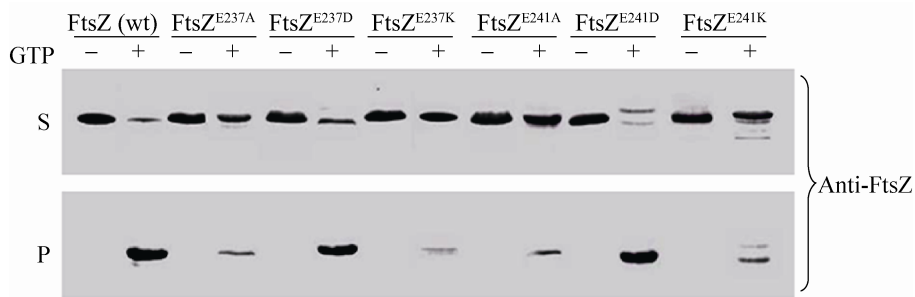


图 5. FtsZ (wt)及其突变体蛋白的体外聚合分析

Figure 5. *In vitro* polymerization analysis of FtsZ (wt) and its mutants. -: absent of GTP; +: present of GTP.

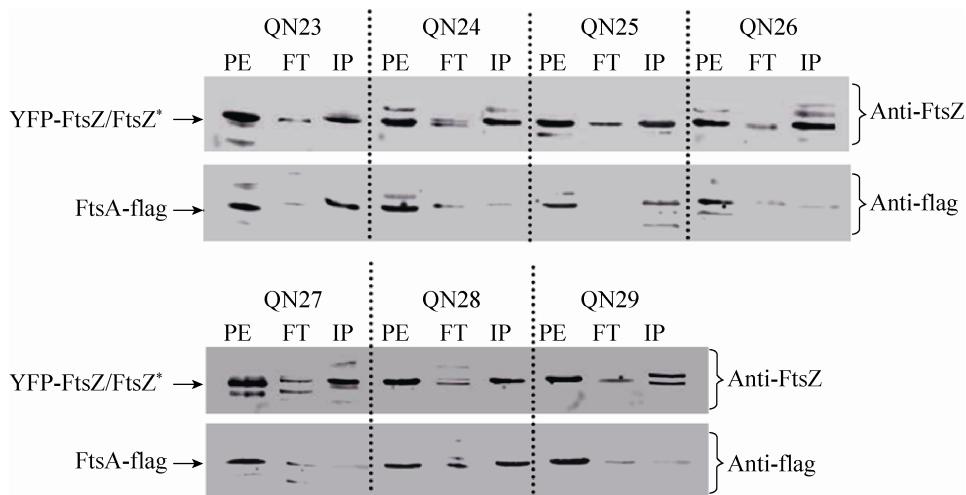


图 6. FtsZ 及其位点突变体与 FtsA 相互作用的免疫共沉淀分析

Figure 6. Co-immunoprecipitation analysis of FtsZ/FtsZ\*-FtsA interaction. PE: protein extract; FT: flow through; IP: immunoprecipitate; QN23: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ*; QN24: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237A</sup>*; QN25: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237D</sup>*; QN26: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237K</sup>*; QN27: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241A</sup>*; QN28: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241D</sup>*; QN29: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241K</sup>*; QN: *mreB::his<sub>6</sub>, ftsA::flag, ΔftsZ-Cat*.

为了证实上述免疫共沉淀结果,我们用表达纯化的 FtsA 蛋白为诱饵(bait)蛋白,经 SDS-PAGE 胶电泳分离、转膜和复性后,通过 Far Western blot 分析发现,QN25 和 QN28 细菌裂解液与复性转印膜孵育所得的 Western blot 分析结果与 QN23 相

似,即 FtsZ<sup>E237D</sup>/FtsZ<sup>E241D</sup>-FtsA 相互作用与 FtsZ-FtsA 相比没有变化;FtsZ<sup>E237A</sup>、FtsZ<sup>E237K</sup>、FtsZ<sup>E241A</sup> 和 FtsZ<sup>E241K</sup> 突变体与 FtsA 相互作用明显减弱,显示 E237A、E237K、E241A 和 E241K 位点突变致 FtsZ-FtsA 相互作用降低(图 7)。

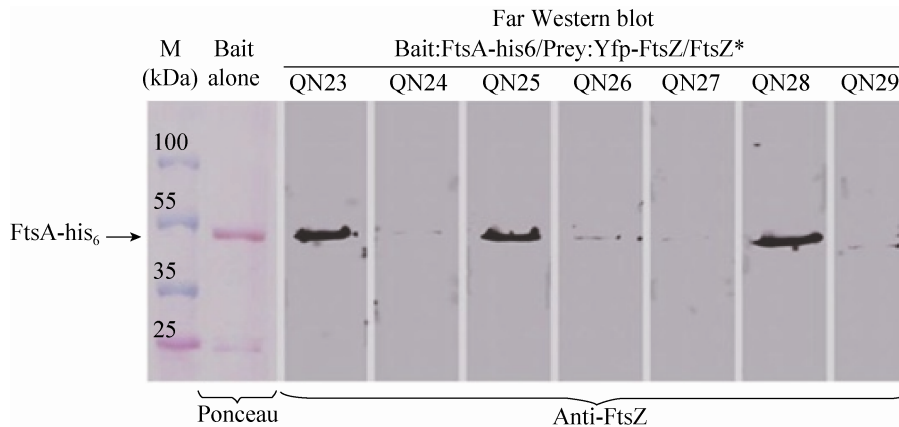


图 7. FtsZ 及其突变体与 FtsA 相互作用的 Far Western blot 分析

Figure 7. Far Western blot analysis of FtsZ/FtsZ\*-FtsA interaction. QN23: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ*; QN24: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237A</sup>*; QN25: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237D</sup>*; QN26: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E237K</sup>*; QN27: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241A</sup>*; QN28: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241D</sup>*; QN29: *QN/P<sub>lac</sub>-yfp::ftsZ<sup>E241K</sup>*; QN: *mreB::his6, ftsA::flag, ΔftsZ-Cat*.

### 3 讨论

近年来,随着临床多种耐药菌的出现,寻找新的药物靶点,开发新一代抗菌药物已迫在眉睫。FtsZ 是微管蛋白的原核类似物,因其在多种致病菌中高度保守,且是金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、结核分枝杆菌、幽门螺旋杆菌等多种致病菌分裂所必需蛋白,现已成为生命科学新的研究热点。FtsZ 单体在菌体内通过纵向相互作用形成原丝,进一步组装形成微丝,再在多种蛋白如 FtsA、zipA、FtsK 等的协调下形成束状结构,最后在即将分裂的菌体中部形成 Z 环和分离体(divisome),指导细菌的分裂。目前关于 FtsZ 组装的具体分子

机制还未完全清楚,主要体现在影响 FtsZ 单体间相互作用和 FtsZ 三维结构的重要氨基酸未完全阐明,尤其是影响 FtsZ 侧面组装的关键氨基酸,这在一定程度上限制了以 FtsZ 的局部结构域为靶点进行新的抗菌药物筛选。

Strauss MP 等研究发现,蛋白局部区域的两性螺旋属性是目标蛋白的重要结构,当这种结构被破坏后,蛋白的组装和/或功能将受到严重影响<sup>[23-24]</sup>,如 FtsA (406-420)区域和我们前期研究中发现的 RNase II (3-19)区域<sup>[17]</sup>。我们通过对 *E. coli* FtsZ 三维结构进行分析发现,FtsZ (236-245)区域位于 FtsZ 蛋白的外侧(图 1-A),轮状图分析该区域具有两性螺旋特性(图 1-B);Stricker 等发现,位于同

一区域的 S245P 突变体可致菌体异常分裂和 FtsZ 的异常组装<sup>[13]</sup>, 推测参入该区域两性螺旋形成的氨基酸可能是影响 FtsZ 组装和功能的重要氨基酸。我们将位于两性螺旋同一极性面的 E273 和 E241 突变为性质不同的氨基酸, 显示 FtsZ<sup>E237A/K</sup> 和 FtsZ<sup>E241A/K</sup> 突变体的功能活性明显降低(图 1-C、D); 膜蛋白分离及 Western blot 分析发现, 将 E237 和 E241 突变为 A (丙氨酸) 时, FtsZ 的膜结合特性增强, E237 和 E241 突变为碱性氨基酸 K (赖氨酸) 时, 其对应的突变体膜结合能力降低(图 3), 提示 E237 和 E241 是 FtsZ (236–241) 结构域的关键氨基酸, 其极性改变可导致该结构域的两性螺旋特性改变, 进而影响 FtsZ 的膜结合特性。虽然到目前为止, 人们对 FtsZ 的氨基酸序列进行分析, 没有发现其能与细胞膜直接结合的特异结构域, 但 FtsZ 与细胞膜相互作用已有多项实验支持, 且该相互作用是其在菌体内正确组装和形成功能性 Z 环的重要基础<sup>[23–25]</sup>。本研究结果目前虽然不能区分 E237 和 E241 是影响 FtsZ 与细胞膜的直接相互作用还是间接相互作用, 但我们首次确认 E237 和 E241 是能影响 FtsZ (236–245) 区域结构及 FtsZ 与细胞膜相互作用和 FtsZ 功能的重要氨基酸, 这一发现对以该区域为靶点设计小分子药物具有一定的指导意义。

FtsZ<sup>E237A/K</sup> 和 FtsZ<sup>E241A/K</sup> 突变体不能在菌体的中部形成规则的 Z 环, 且细胞多数呈长丝状(图 2-B、D、E、G), 提示 E237A/K 和 E241A/K 突变可致 FtsZ 单体异常组装, 进而影响菌体的正常分裂。为了进一步探索这些突变体异常组装的分子机制, 我们尝试通过体外实验检测 E237A/K 和 E241A/K 位点突变是否改变了单体形成聚合体的特性。首先构建带 his 标签的各突变体融合表达质粒, 通过亲和纯化得到相应的目标蛋白; 非变性

胶电泳分离和 Western blot 分析发现, 与野生型 FtsZ 相比, 将 E237 和 E241 突变为性质相同的氨基酸, FtsZ 的聚合特性没有发生明显的改变, 而 E237A/K 和 E241A/K 位点突变, 可导致相应的突变体不能形成较大分子的聚合体(图 4)。体外聚合分析也进一步证实了上述实验结果(图 5)。

Loose M 和 Pichoff S 等报道, FtsA 和 ZipA 等蛋白通过与 FtsZ C 端的结构域相互作用, 可将 FtsZ 附着在细胞的内膜, 影响 FtsZ 组装成功能性 Z 环及 Z 环的稳定, 进而影响细菌的分裂<sup>[12,25]</sup>。E237A/K 和 E241A/K 位点突变可致 FtsZ-FtsA 相互作用明显降低(图 6), 且 Far Western blot 也得到相似的结果(图 7)。那么, 并不位于 FtsZ C 端的 E237 和 E241 为何能影响 FtsZ-FtsA 的相互作用呢? 我们推测: (1) FtsZ 的 C 端虽然是与 FtsA 相互作用的重要结构域, 但这种相互作用需要蛋白具有一定的空间构象。将 E237 和 E241 突变为性质不同的氨基酸, 可能改变 FtsZ 某一些区域的空间结构, 从而对 FtsZ 和 FtsA 的相互作用产生一定的空间位阻; (2) FtsZ-FtsA 相互作用需要 FtsZ 与细胞膜的适度相互作用辅助, 这种适度相互作用可能影响 FtsZ 单体的折叠和 C 端结构域的充分暴露。具体机制还在进一步探索中。

本研究首次发现, FtsZ (237–245) 结构域的两性螺旋特性是 FtsZ 正确组装和 FtsZ-FtsA 相互作用的重要基础; E237 和 E241 是影响 FtsZ (237–245) 结构域两性螺旋特性的重要氨基酸。虽然, 我们的结果目前还不能有效地区别 E237A/K 和 E241A/K 位点突变所致的 FtsZ 膜结合特性及 FtsZ-FtsA 相互作用的改变何者是影响 FtsZ 组装和功能的重要原因, 但相关机制的进一步探索和揭示, 将有助于加深对 FtsZ 组装的理解和对 FtsZ 作为新的抗菌药物靶点的开发和利用。

## 参考文献

- [1] Buddelmeijer N, Beckwith J. Assembly of cell division proteins at the *E. coli* cell center. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5(6): 553–557.
- [2] Bernhardt TG, De Boer PAJ. The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Molecular Microbiology*, 2003, 48(5): 1171–1182.
- [3] Lutkenhaus J. Dynamic proteins in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5(6): 548–552.
- [4] Schmidt KL, Peterson ND, Kustus R, Wissel MC, Graham B, Phillips GJ, Weiss DS. A predicted ABC transporter, FtsEX, is needed for cell division in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(3): 785–793.
- [5] Weiss DS. Bacterial cell division and the septal ring. *Molecular Microbiology*, 2004, 54(3): 588–597.
- [6] Randich AM, Brun YV. Molecular mechanisms for the evolution of bacterial morphologies and growth modes. *Frontier in Microbiology*, 2015, 6: 580.
- [7] Galli E, Gerdes K. FtsZ-ZapA-ZapB interactome of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(2): 292–302.
- [8] Chen JC, Beckwith J. FtsQ, FtsL and FtsI require FtsK, but not FtsN, for co-localization with FtsZ during *Escherichia coli* cell division. *Molecular Microbiology*, 2001, 42(2): 395–413.
- [9] Monahan LG, Robinson A, Harry EJ. Lateral FtsZ association and the assembly of the cytokinetic Z ring in bacteria. *Molecular Microbiology*, 2009, 74(4): 1004–1017.
- [10] Lan GH, Daniels BR, Dobrowsky TM, Wirtz D, Sun SX. Condensation of FtsZ filaments can drive bacterial cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(1): 121–126.
- [11] Huo YJ, Lu QN, Zheng XW, Ma YF, Lu F. E75, R78 and D82 of *Escherichia coli* FtsZ are key residues for FtsZ cellular self-assembly and FtsZ-MreB interaction. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(2): 264–274. (in Chinese)  
霍雨佳, 卢乔楠, 郑晓伟, 马远方, 卢锋. E75、R78 和 D82 是影响大肠埃希氏菌 FtsZ 自身组装及其与 MreB 相互作用的重要氨基酸. *微生物学报*, 2016, 56(2): 264–274.
- [12] Loose M, Mitchison TJ. The bacterial cell division proteins FtsA and FtsZ self-organize into dynamic cytoskeletal patterns. *Nature Cell Biology*, 2014, 16(1): 38–46.
- [13] Stricker J, Erickson HP. *In vivo* characterization of *Escherichia coli* ftsZ mutants: effects on Z-ring structure and function. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(16): 4796–4805.
- [14] de Boer PAJ, Crossley RE, Rothfield LI. A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. *Cell*, 1989, 56(4): 641–649.
- [15] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [16] Zheng XW, Lu QN, Huo YJ, Ma YF, Lu F. Analysis of the key amino acids involved in the function and cellular self-assembly of FtsZ protein in *Escherichia coli* strains. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2015, 35(4): 241–246. (in Chinese)  
郑晓伟, 卢乔楠, 霍雨佳, 马远方, 卢锋. 影响大肠埃希菌 FtsZ 功能和自身组装的重要氨基酸分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2015, 35(4): 241–246.
- [17] Lu F, Taghbalout A. Membrane association via an amino-terminal amphipathic helix is required for the cellular organization and function of RNase II. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(10): 2741–2751.
- [18] Ishidate K, Creeger ES, Zrike J, Deb S, Glauner B, Macalister TJ, Rothfield LI. Isolation of differentiated membrane domains from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, including a fraction containing attachment sites between the inner and outer membranes and the murein skeleton of the cell envelope. *The Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261(1): 428–443.
- [19] Aaron M, Charbon G, Lam H, Schwarz H, Vollmer W, Jacobs-Wagner C. The tubulin homologue FtsZ contributes to cell elongation by guiding cell wall precursor synthesis in *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology*, 2007, 64(4): 938–952.
- [20] Lu F, Taghbalout A. The *Escherichia coli* major exoribonuclease RNase II is a component of the RNA degradosome. *Bioscience Reports*, 2014, 34(6): e00166.
- [21] Cormack RS, Genereaux JL, Mackie GA. RNase E activity is conferred by a single polypeptide: overexpression, purification, and properties of the *ams/rne/hmp1* gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(19): 9006–9010.
- [22] Vanzo NF, Li YS, Py B, Blum E, Higgins CF, Raynal LC, Krisch HM, Carpousis AJ. Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes & Development*, 1998, 12(17): 2770–2781.
- [23] Strauss MP, Liew ATF, Turnbull L, Whitchurch CB, Monahan

- LG, Harry EJ. 3D-SIM super resolution microscopy reveals a bead-like arrangement for FtsZ and the division machinery: implications for triggering cytokinesis. *PLoS Biology*, 2012, 10(9): e1001389.
- [24] Holden SJ, Pengo T, Meibom KL, Fernandez FC, Collier J, Manley S. High throughput 3D super-resolution microscopy reveals *Caulobacter crescentus in vivo* Z-ring organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(12): 4566–4571.
- [25] Pichoff S, Lutkenhaus J. Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Molecular Microbiology*, 2005, 55(6): 1722–1734.

## Effect of amphipathic helix characteristics of FtsZ (236–245) domain on FtsZ assembly and its function in *Escherichia coli* strains

Qingsu Ma<sup>1,2#</sup>, Huijuan Zhang<sup>1#</sup>, Xiaowei Zheng<sup>1</sup>, Yujia Huo<sup>1</sup>, Feng Lu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Henan Engineering Laboratory of Antibody Medicine, Medical School of Henan University, Kaifeng 475001, Henan Province, China

<sup>2</sup> People's Hospital of Puyang City, Puyang 457000, Henan Province, China

**Abstract: [Objective]** To study the effect of amphipathic helix characteristics of FtsZ (236–245) domain on FtsZ assembly and interaction of FtsZ with FtsA in *Escherichia coli* strains. **[Methods]** We constructed FtsZ and its mutant's plasmids by molecular clone and site-directed mutagenesis, and purified targeted proteins using affinity chromatography. QN23-QN29 strains were constructed by linear DNA homologous recombination and P1 transduction. We observed cellular localization patterns of FtsZ and its mutants in *E. coli* by living cell imaging experiments, examined membrane binding properties of FtsZ mutants by membrane proteins isolation and Western blot analysis, and analyzed interaction of FtsZ/FtsZ\* with FtsA by Co-immunoprecipitation and far Western blot. Native gel separation and *in vitro* polymerization experiments were done to check effects of FtsZ point mutation on FtsZ assembly. **[Results]** Yfp-labeled FtsZ<sup>E237A/K</sup> and FtsZ<sup>E241A/K</sup> mutant proteins failed to localize in *E. coli* strains, assemble into functional Z-ring structure, and had decreased function of FtsZ (wt). *In vitro* experiments showed that E237A/K and E241A/K mutations of FtsZ decreased the polymerization efficiency of FtsZ monomer, weakened FtsZ\*-FtsA interaction and changed membrane binding properties of FtsZ. **[Conclusion]** FtsZ E237 and E241 are critical amino acids that affect the amphipathic helix characteristics of FtsZ (236–245) domain, FtsZ assembly and FtsZ-FtsA interaction in *E. coli* strains.

**Keywords:** *Escherichia coli*, FtsZ mutant (FtsZ\*), FtsA, amphipathic helix

(本文责编: 李磊)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-23880398; E-mail: lufeng@henu.edu.cn

# These authors contributed equally to this work.

Received: 22 July 2016; Revised: 26 December 2016; Published online: 19 January 2017