



START 家族 Rv0164 蛋白在耻垢分枝杆菌中的表达及垂钧互作蛋白

周盈¹, 魏文静², 江宝怡¹, 李金山³, 毕利军^{1,4*}

¹佛山科学技术学院生物医学工程系, 广东 佛山 528000

²广东省结核病控制中心, 广东 广州 510630

³华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070

⁴中国科学院生物物理研究所核酸生物学重点实验室, 北京 100101

摘要:【目的】START 家族蛋白的突变或者错误表达使哺乳动物产生肾上腺皮质增生、乳腺癌和结肠癌等疾病; START 家族蛋白是植物发育过程中重要的调节因子; 尚未阐明 START 家族蛋白作为细菌必需基因的作用机制。结核分枝杆菌必需基因 Rv0164 属于 START 家族, 功能未知, 研究 Rv0164 作用机制将为 START 家族分子机制增添新理论。【方法】生物信息学方法分析 Rv0164 序列特征; 模式菌耻垢分枝杆菌中表达 Rv0164 并分析蛋白的细胞定位; Co-immunoprecipitation (Co-IP)方法垂钧 Rv0164 的相互作用蛋白, 质谱鉴定互作蛋白, 酵母双杂交和 Pull down 验证蛋白相互作用。【结果】Rv0164 的 N 端 17 个氨基酸在分枝杆菌中不保守; Rv0164 无信号肽; Rv0164 定位在细胞质中, 受蛋白降解机制调控, 该机制在细菌生长平台期比对数期活性弱; N 端缺失使 Rv0164 在平台期和对数期均不稳定; Rv0164 结合多个胞内蛋白。【结论】Rv0164 的 N 端肽段增加了蛋白的稳定性; Rv0164 是一个胞内蛋白; Rv0164 能够结合细菌生存必需蛋白。

关键词: START 家族, Rv0164, 蛋白定位, 蛋白-蛋白相互作用

1994 年 Clark 等首次从小鼠中鉴定并命名了 StAR 蛋白(steroidogenic acute regulatory protein), 该线粒体蛋白负责转运脂类, 参与胆固醇代谢^[1]。随后的研究表明具有类似结构的蛋白广泛分布在

细菌、真菌、动物和植物中, 不同的序列特征决定这类蛋白结合的底物类型^[2]。Iyer 等将具有类似结构的蛋白归为 START (StAR-related lipid transfer domain)家族^[3]。越来越多的研究表明 START 家族

基金项目: 佛山科学技术学院科研启动项目

*通信作者。Tel/Fax: +86-10-64888464; E-mail: blj@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2019-05-05; 修回日期: 2019-07-07; 网络出版日期: 2019-11-19

蛋白不仅能够作为脂质转运蛋白, 还能够结合其他结构域发挥脂类感应功能。此外, 在链霉菌中还发现了一类具有酶学活性的 START 家族蛋白——聚酮环化酶。哺乳动物 START 家族蛋白的突变或者错误表达产生肾上腺皮质增生、乳腺癌和结肠癌等疾病; START 家族蛋白是植物发育过程的关键调节因子; 尚未阐明 START 蛋白作为细菌必需基因的作用机制^[1, 4-7]。研究细菌 START 蛋白将为 START 家族分子机制增添新理论, 并为动物和植物生理和病理研究提供新视角。

不同物种之间 START 家族蛋白数量相差很大, 真核生物一般有多个 START 蛋白, 例如拟南芥有 59 个^[3]。大部分原核生物仅有一个 START 蛋白, 例如枯草芽孢杆菌和大肠杆菌^[6-7]。比较特殊的是天蓝色链霉菌和结核分枝杆菌, 分别有 13 个和 18 个 START 蛋白, 链霉菌含有大量 START 蛋白可能与该菌产多种次生代谢物相关^[3]。结核分枝杆菌的 18 个 START 蛋白中, Rv0088、Rv0164 和 Rv2186c 是结核分枝杆菌生存必需基因, 其他为非必需基因, NCBI 标注 Rv0088 为甲酸氢化酶复合物亚基, 其他标注为 hypothetical protein。结核分枝杆菌不产次生代谢物, 尚不清楚结核分枝杆菌基因组包含大量 START 基因的原因。

Rv0164 首次发现于结核分枝杆菌的培养液上清, 具有 B 细胞和 T 细胞免疫原性^[8-9]。我们用结核分枝杆菌全蛋白芯片和病人血清开展分子标志物研究, 发现 Rv0164 具有诊断标志物特性, 并开发了一款结核病诊断试剂盒(专利号 CN201310608295)。尝试结构生物学方法探讨 Rv0164 功能, 但是 Rv0164 在大肠杆菌表达体系中蛋白得率低, 并且无法获得较好的晶体衍射数据。MSMEG_0129 是 Rv0164 在耻垢分枝杆菌中的同源蛋白, MSMEG_0129 的三维结构与 START

家族聚酮环化酶相似, 但是缺少环化反应的关键氨基酸^[10], 说明 Rv0164 和 MSMEG_0129 的功能与已知的细菌 START 蛋白作用机制不同。本研究分析了 Rv0164 的序列组成、细胞定位和胞内互作蛋白, 结合组学数据库信息, 提出 Rv0164 的可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

添加 0.5% 甘油和 0.05% 吐温 80 的 LB 培养基 37 °C 振荡培养耻垢分枝杆菌。卡那霉素使用浓度为 30 µg/mL (购自 Amersco)、四环素(购自 Amersco) 使用浓度为 0–80 ng/mL。GroEL 抗体购自 Santa Cruz 公司, HRP 标记的小鼠抗体购自 Promega 公司。Western 及 IP 细胞裂解液和银染试剂盒购自碧云天公司。His 抗体、FLAG 抗体和 FLAG 抗体偶联磁珠购自 Sigma 公司。

重组质粒 pMIND-Rv0164 和 pMIND-Rv0164 (-17aa) 的构建策略为在酶切位点 *Bam*H I 和 *Eco*R V 之间连入 His 标签的表达序列、*Eco*R V 和 *Pac* I 之间连入目标基因, His 标签融合表达在目标基因 N 端。重组质粒 pMV261-Rv0164-FLAG 的构建策略为 *Eco*R I 和 *Hind* III 之间连入不含终止密码子的 Rv0164 基因, *Hind* III 和 *Sal* I 之间连入 FLAG 标签的表达序列, FLAG 标签融合表达在 Rv0164 基因 C 端。重组质粒经序列测定验证正确后, 电转化耻垢分枝杆菌野生菌 *Mycobacterium smegmatis* MC² 155。

1.2 蛋白定位

耻垢分枝杆菌培养液经 4 °C 离心分为培养上清和细胞沉淀两部分。沉淀部分超声破碎细胞, 4 °C 离心去除细胞碎片, 获得胞内总蛋白。培养

上清通过 0.22 μm 过滤器, 截留分子量 3 kDa 浓缩管进行浓缩。直接比色法测定上清和胞内总蛋白的蛋白浓度, 30 μg 蛋白进行 10% SDS-PAGE 分离, GroEL 抗体、His 抗体、HRP 标记的小鼠抗体进行 Western blotting 检测。

1.3 免疫共沉淀

4 $^{\circ}\text{C}$ 离心收集菌体, Western 及 IP 细胞裂解液重悬菌体。超声破碎细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心去除细胞碎片, 获得胞内总蛋白。FLAG 抗体偶联磁珠与胞内全蛋白 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 随后裂解液和 TBS (50 mmol/L Tris HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4) 分别清洗磁珠 5 次。两种溶液分别孵育柱材料获得洗脱蛋白: (1) 0.1 mol/L glycine HCl pH 3.5 溶液; (2) SDS-PAGE 上样缓冲液。

1.4 蛋白胶银染

10% SDS-PAGE 分离免疫共沉淀获得的洗脱蛋白, 去离子水清洗凝胶, 按照银染试剂盒说明书进行蛋白胶银染。

1.5 质谱鉴定蛋白质

蛋白胶银染后, 切下凝胶, 依次用 50% (V/V) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 清洗、100 mmol/L NH_4HCO_3 浸泡以及胰蛋白酶 trypsin 消化。获得的肽段混合物用 C_{18} 反相柱在配置 EASY-nL 1200 系统的 Q Exactive 组合型四极杆 Orbitrap 质谱仪上进行蛋白质鉴定。MS/MS 谱图用 MASCOT 引擎搜索 NCBI 的 *Mycobacterium smegmatis* MC² 155 和 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 数据库。质谱鉴定参数设置为 Peptide mass tolerance=20 ppm、MS/MS tolerance=0.1 Da、Enzyme=Trypsin、Missed cleavage=2、Fixed modification Carbamidomethyl (C)、Variable modification Oxidation (M)。

1.6 酵母双杂交

Matchmaker® Gold yeast two Hybrid 试剂盒 (购自 TaKaRa) 用于检测蛋白质相互作用。以结核分枝杆菌标准菌株 H37Rv 基因组为模板, 扩增 Rv0164 和 Rv3002c 基因, 无缝克隆方法分别插入 pGBKT7 和 pGADT7 载体的 *EcoR* I 和 *Bam*H I 位点之间, 重组质粒送测序公司验证插入序列。按照试剂盒流程转化酵母菌, 重组酵母菌涂布质粒筛选培养基 SD/-Trp/-Leu/获得含有双质粒的酵母菌。挑取 SD/-Trp/-Leu/培养基上的酵母单菌落, 无菌生理盐水制备菌悬液, 2 μL 菌液分别接种质粒筛选培养基和蛋白互作筛选培养基 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X-alpha-Gal, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至菌苔出现。

1.7 Pull down

以结核分枝杆菌标准菌株 H37Rv 基因组为模板扩增 Rv3002c 基因, 以载体 pGEX6p-1 为模板扩增 GST 基因, 重叠 PCR 获得 GST-Rv3002c 融合基因, 无缝克隆方法插入载体 pET28a 的 *Nco* I 和 *Hind* III 位点之间, GST-Rv3002c 的 C 端融合表达 His 标签, 重组质粒送测序公司验证插入基因。重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3), 0.4 mmol/L IPTG 16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导重组菌 12 h, 收集胞内可溶蛋白, Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱富集 GST-Rv3002c。不同浓度的咪唑溶液依次洗脱蛋白, SDS-PAGE 检测洗脱蛋白中 GST-Rv3002c 的浓度和纯度。经缓冲液 A (20 mmol/L Tris pH 8.0, NaCl 100 mmol/L, 5% 甘油) 透析和截留分子量 10 kDa 浓缩管, 获得大量高纯度 GST-Rv3002c。

GST-Rv3002c 与 Glutathione Sepharose 4B beads 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 缓冲液 A 清洗柱材料 5 次, 获得 GST-Rv3002c 柱材料。重组质粒 pMV261-Rv0164-FLAG 电转化野生菌 *M. smegmatis* MC²

155 获得 Rv0164 过表达菌株。37 °C 振荡培养 Rv0164 过表达菌, 收集胞内全蛋白与 GST-Rv3002c 柱材料 4 °C 孵育 1 h, 缓冲液 A 清洗柱材料 5 次, SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱柱材料上结合的所有蛋白, His 抗体和 FLAG 抗体 Western blotting 检测洗脱蛋白。Pull down 设置两组对照, 第 1 组为 GST-Rv3002c 柱材料不与过表达菌胞内全蛋白孵育, 其他实验步骤与 Pull down 样品相同, 第 2 组设置样品为过表达菌的胞内全蛋白。

2 结果和分析

2.1 同源蛋白 Rv0164 和 MSMEG_0129 的序列特征

结核分枝杆菌是经呼吸道传染的病原菌, 在生物安全实验室才能开展研究工作, 因此常用非致病菌耻垢分枝杆菌作为模式菌研究分枝杆菌的蛋白功能以及筛选分子药靶的抑制剂, 大部分同源蛋白在结核分枝杆菌和耻垢分枝杆菌中执行相同的生理功能^[11-12]。同源蛋白 Rv0164 和 MSMEG_0129 的序列相似性高, 各自被证明是细

菌生存的必需基因^[10,13], 表明两者的生理功能相似或者完全相同。

NCBI 标注 Rv0164 有 161 个氨基酸, 与上游基因 Rv0163 的转录方向相同, 与邻近基因 Rv0162 和 Rv0165 的转录方向相反, Rv0163 和 Rv0164 基因相距 54 个碱基, 以上特性表明 Rv0163 和 Rv0164 可能属于一个操纵子。Roback 等分析了 474 份结核分枝杆菌 Microarray 实验数据^[14], 发现 Rv0163 和 Rv0164 转录水平相关性低, 表明 Rv0163 和 Rv0164 不属于一个操纵子。

MSMEG_0129 与 Rv0164 的基因组环境相似。MSMEG_0129 与上游基因 MSMEG_0128 的转录方向相同, 与邻近基因 MSMEG_0127 和 MSMEG_0130 的转录方向相反, MSMEG_0129 与上游基因 MSMEG_0128 间隔 26 个碱基。NCBI 标注 MSMEG_0129 为 144 个氨基酸, 比 Rv0164 少 17 个氨基酸。如图 1 所示, 序列比对表明 MSMEG_0129 第 2 个氨基酸对应于 Rv0164 第 19 个氨基酸, 随后的 6 个氨基酸在分枝杆菌属 4 个菌种中保守, 表明 Rv0164 的 N 端 17 个氨基酸在分枝杆菌属中不保守。

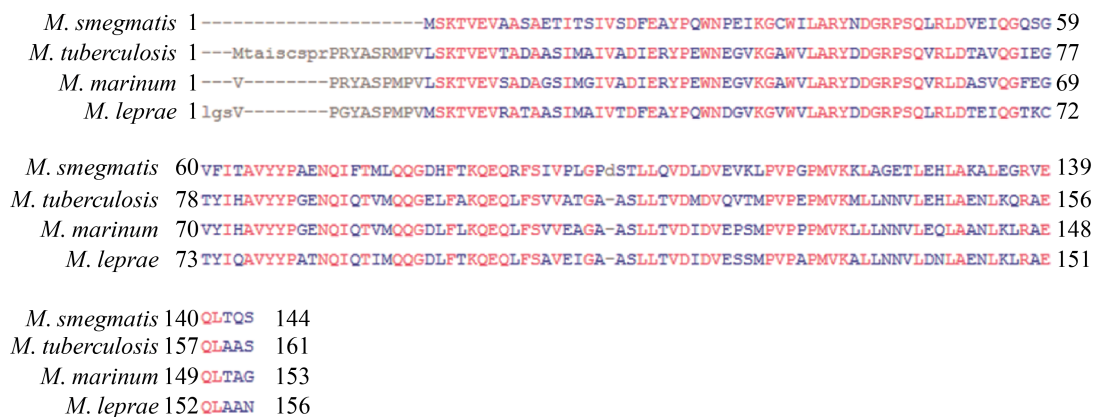


图 1. 不同分枝杆菌 Rv0164 同源蛋白的序列比对

Figure 1. Sequence alignment of Rv0164 homologous proteins. The identity between *M. tuberculosis* Rv0164 and *M. smegmatis* MSMEG_0129 is 87/144 (60%), *M. tuberculosis* Rv0164 and *M. marinum* MMAR_0407 129/153 (84%), *M. tuberculosis* Rv0164 and *M. leprae* ML2629c 116/156 (74%).

为什么 MSMEG_0129 比 Rv0164 序列短? 三种可能性, 一种是 MSMEG_0129 序列标注有误, 一种是 Rv0164 的 N 端是信号肽, 第三种是 Rv0164 的 N 端有其他功能。将 NCBI 标注的 MSMEG_0129 阅读框前移 3 的倍数, MSMEG_0128 和 MSMEG_0129 阅读框之间的序列能够翻译为 RYARRMPL, 该肽段与 Rv0164 的 N 端无相似性, 因此排除了 MSMEG_0129 阅读框标注有误。

进一步通过 SignalP 分析 Rv0164 是否包含信号肽^[15]。Mycolyl transferase 85A (基因名称 *fbpA*, 基因编号 Rv3804c) 是分泌蛋白, 伴侣蛋白 GroEL (基因名称 *groEL1*, 基因编号 Rv3417c) 是胞内蛋白, 分别作为 SignalP 的阳性对照和阴性对照。一

般信号肽区域的 S 值高, 信号肽剪切位点的 C 值高; 当序列中预测有多个信号肽剪切位点时, 剪切位点只有一个, 为 S 值降低和 C 值高的位点; D 值是平均 S 值和平均 C 值的平均值, 判断蛋白具有信号肽的 Cutoff 值为 0.4^[16]。Rv0164、FbpA、GroEL 和 MSMEG_0129 的 D 值分别为 0.391、0.437、0.129 和 0.137。MSMEG_0129 的 D 值小于 0.4, 说明为胞内蛋白。Rv0164 的 D 值与 Cutoff 值相差不大。如果 Rv0164 是分泌蛋白, 信号肽剪切位点是第 30 位氨基酸, 但是第 11–30 位氨基酸之间 S 值低, 不符合信号肽特性, 因此排除了 Rv0164 具有信号肽。以上结果表明 Rv0164 的非保守 N 端多肽可能有其他的功能(图 2)。

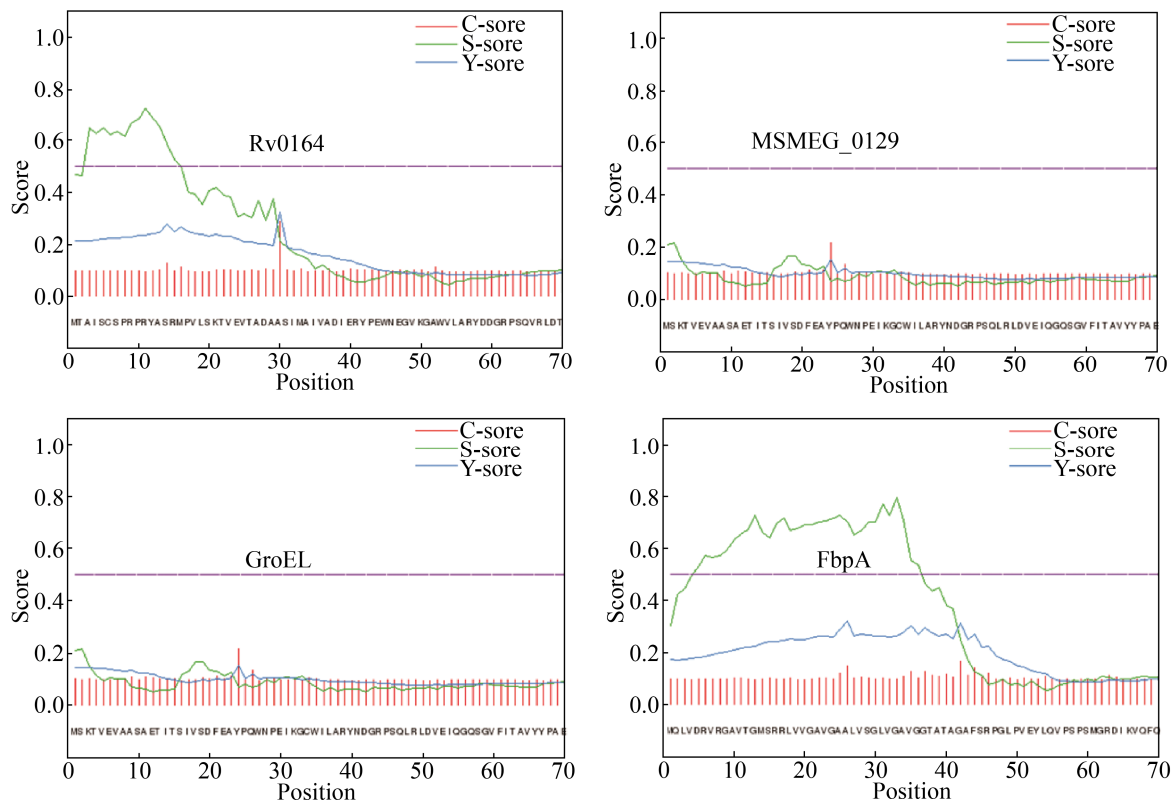


图 2. SignalP 分析蛋白的信号肽

Figure 2. Signal peptide prediction by SignalP. The cytosolic protein GroEL and secretory protein FbpA were set as negative and positive control, respectively.

2.2 Rv0164 是胞内蛋白

分枝杆菌表达体系通常使用四环素或者乙酰胺作为诱导剂, 或者通过高温培养诱导 hsp60 启动子超量表达目标基因^[17-18]。本实验利用四环素诱导表达质粒 pMIND 在耻垢分枝杆菌中表达 Rv0164, Rv0164 的 N 端融合表达 His 标签用于 Western blotting 检测。

检测细菌生长对数期和平台期时 Rv0164 在胞内和胞外的分布, GroEL 作为上样量和胞内定位的对照蛋白。GroEL 是分枝杆菌组成性表达的胞内蛋白, 在培养上清中也能检测到 GroEL 的可能原因是细菌裂解^[19]。如图 3-A 所示, 对数期胞内蛋白中检测到 Rv0164 而胞外无 Rv0164 杂交条带, 说明 Rv0164 在耻垢分枝杆菌中表达时是一个胞内蛋白, 与 Rv0164 不含信号肽是一致的。平台期胞内蛋白和培养上清均未检测到 Rv0164 蛋白, 可能原因是平台期添加的诱导剂到平台期时失效。

检测缺失 N 端非保守肽段的 Rv0164 截短体的细胞定位, 仅胞内蛋白样品中检测到 Rv0164 (-17aa), 而且不同的单菌落出现不同的杂交带型(图 3-B)。其中单菌落 2 的带型单一, 并且该条带在单菌落 1 和 3 中重复出现, 表明该条带为 Rv0164 (-17aa)。单菌落 1 和 3 分别比单菌落 2 多了 2 条和 1 条略小的杂交条带, 而 His 标签融合表达在基因 N 端, 说明 Rv0164(-17aa)的 C 端发生了部分降解。以上结果表明 Rv0164(-17aa)的蛋白稳定性低于全长 Rv0164, 说明 Rv0164 的 N 端非保守肽段与蛋白稳定性相关。

2.3 Rv0164 蛋白在平台期比对数期稳定

添加不同浓度的诱导剂, 检测对数期 Rv0164 的动态变化特性。无诱导剂时, 诱导菌 *M. smegmatis* MC² 155/pMIND-Rv0164 的胞内蛋白在检测时间

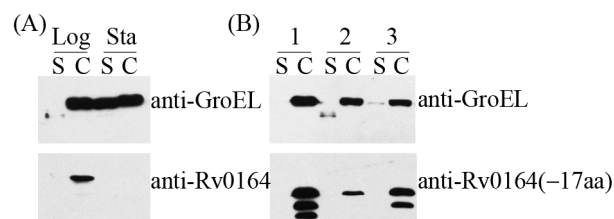


图 3. Rv0164 和其截断体在耻垢分枝杆菌中的表达和定位

Figure 3. Expression and localization of Rv0164 and its truncated mutant in *Mycobacterium smegmatis*. A: Expression of Rv0164 in the strain *M. smegmatis* MC² 155/pMIND-Rv0164 at $OD_{600}=0.5$ (Log) and $OD_{600}=2$ (Sta) was detected by Western blotting. B: Expression of the N-terminal 17 residue truncated mutant in the strain *M. smegmatis* MC² 155/pMIND-Rv0164(-17aa); logarithmic phase culture of 3 colonies was detected by Western blotting. Secreted proteins in the culture supernatant and cytosolic proteins in the cell cytoplasm are labeled as S and C, respectively. GroEL was used as an internal control.

内无 Rv0164 (图 4), 说明 pMIND 质粒无泄漏表达。20 ng/mL 诱导剂时, 除了第 2 小时和第 3 小时, 其他时间点未检测到胞内 Rv0164; 40 ng/mL 诱导剂时, 除了第 6 小时, 其他时间点均可检测到胞内 Rv0164; 80 ng/mL 诱导剂时, 6 个时间点均可检测到胞内 Rv0164; 每个诱导剂浓度的检测时间内 Rv0164 呈现先增加后降低的变化趋势(图 4-A)。而诱导剂浓度越高, pMIND 质粒表达目标蛋白的数量越多^[17]。以上数据说明除了诱导剂的蛋白增量效应, 同时存在胞内蛋白减量效应, 低浓度诱导剂产生蛋白的速度低于胞内蛋白减量效应。

平台期诱导菌补加诱导剂 80 ng/mL, 检测平台期胞内 Rv0164 的动态变化特性。如图 4-B 所示, 3 h 内 Rv0164 杂交信号相同, 说明平台期添加诱导剂产生的 Rv0164 数量比较稳定, 此时诱导剂的蛋白增量效应与胞内蛋白减量效应趋于平衡。

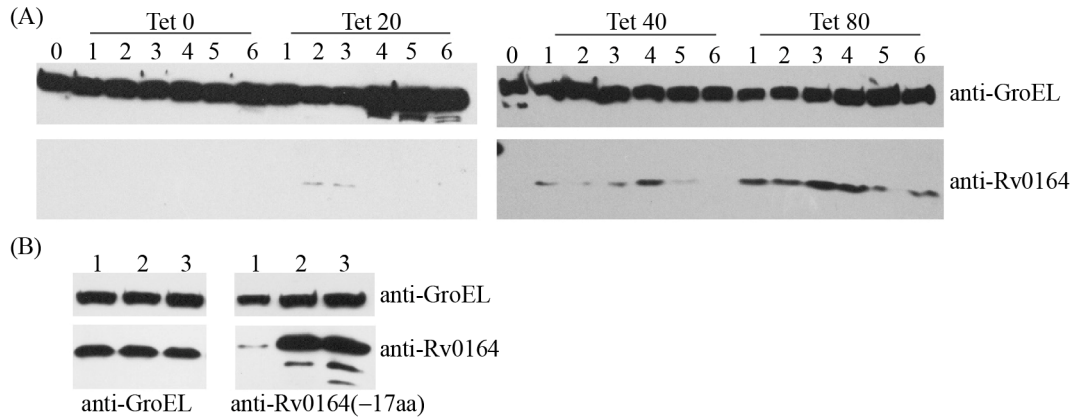


图 4. 胞内 Rv0164 蛋白的动态变化

Figure 4. Dynamic model of intracellular Rv0164. A: Cytoplasmic Rv0164 in the strain *M. smegmatis* MC² 155/pMIND-Rv0164 was detected by Western blotting using a monoclonal anti-polyHistidine antibody; logarithmic bacterial cells were applied with different concentration of tetracycline (20 ng/mL, 40 ng/mL and 80 ng/mL); samples were harvested at 1 hour intervals. B: Stationary bacterial cells ($OD_{600}=2$) of the strains *M. smegmatis* MC² 155/pMIND-Rv0164 and *M. smegmatis* MC² 155/pMIND-Rv0164(-17aa) were applied with 80 ng/mL tetracycline and samples were harvested at 1 hour intervals. GroEL was used as an internal control.

相同的策略检测平台期胞内 Rv0164(-17aa) 的动态变化特性。Rv0164(-17aa) 诱导菌在补加诱导剂的第 2 小时、第 3 小时比第 1 小时的杂交信号强，并且随着培养时间的延长，杂交带型越多，说明诱导剂产生蛋白的速度高于胞内蛋白减量效应，较小的杂交条带是 Rv0164(-17aa) 的 C 端逐步降解产生。以上结果表明全长 Rv0164 在平台期比对数期稳定，Rv0164 截短体在平台期也不稳定。

2.4 垂钓 Rv0164 互作蛋白

前面实验结果表明平台期时全长 Rv0164 更稳定，因此选用平台期 Rv0164 表达菌进行垂钓互作蛋白实验。平台期 *M. smegmatis* MC² 155/pMV261-Rv0164-FLAG 菌液，一部分继续 37 °C 培养 3 h，另一部分转移到 42 °C 培养 3 h，分别收集上清蛋白和胞内蛋白，SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色检测全部蛋白。如图 5-A 所示 42 °C 比 37 °C 培养上清中蛋白种类更多，并且 42 °C 胞内和上清蛋白的条带相似性比 37 °C 高，可能原因是高温使细菌受

到损伤，部分细菌裂解，胞内蛋白溢出。42 °C 胞内蛋白与 37 °C 胞内蛋白相比，蛋白种类无显著差异，蛋白丰度发生变化，例如图 5-A 箭头 1 和 2 所示的蛋白条带。以上结果表明 42 °C 培养使细菌胞内和胞外蛋白发生了变化。

用 FLAG 抗体偶联柱材料分别与 37 °C 和 42 °C 胞内蛋白孵育，富集 Rv0164 以及能够与 Rv0164 相互作用的蛋白，蛋白上样缓冲液破坏抗体与柱材料间的偶联作用，洗脱柱材料上结合的所有蛋白。设置两组阴性对照，一组是柱材料未与蛋白孵育，一组是携带 pMV261 的重组菌的胞内蛋白与柱材料孵育。如图 5-B 所示，分子量为 55 kDa 和 25 kDa 的高丰度蛋白分别为 FLAG 抗体的重链和轻链，与阴性对照相比，37 °C 胞内样品富集蛋白在 15 kDa 和 25 kDa 之间多了一个蛋白条带，切割该区域进行质谱分析，质谱分析的肽段覆盖 Rv0164 序列 55.3%。与阴性对照相比，42 °C 胞内样品在 15 kDa 和 25 kDa 之间多了几个

蛋白条带,其中丰度最高的蛋白条带在 37 °C 样品中也存在,切割该区域凝胶质谱鉴定蛋白组成,质谱分析的肽段覆盖 Rv0164 序列 43.5%。以上结果表明 42 °C 培养 3 h 的方案能够获得较多的 Rv0164 互作蛋白。

2.5 质谱鉴定互作蛋白

蛋白上样缓冲液洗脱柱材料上的富集蛋白时,洗脱液中含有较多 FLAG 抗体(图 5-B)。glycine HCl 溶液作为洗脱溶液时,洗脱蛋白中 FLAG 抗体明显减少, Rv0164 互作蛋白条带更加清晰(图 5-C)。切割互作蛋白中的 3 条主带(图 5-C 箭头标注),质谱鉴定蛋白组成。

质谱结果搜索数据库获得互作蛋白列表,大部分蛋白的信号值和肽段覆盖度较低,设定筛选参数排除假阳性蛋白。互作蛋白中 hypothetical protein LI98 的 Intensity 值最高(约为 8×10^9),取最高信号值的 0.1% 设为阈值排除假阳性蛋白,获得

280 个较高信号值的蛋白。其次设定肽段覆盖度阈值为 40%, 280 个蛋白中有 24 个满足筛选条件。为了进一步提高互作蛋白的可信度,进行了第 2 次独立的垂钓实验。第 2 次获得的互作蛋白列表中满足 Intensity 值大于 8×10^6 的蛋白有 211 个,同时满足肽段覆盖度大于 40% 的蛋白有 24 个。2 次独立实验中均满足筛选条件的互作蛋白有 7 个,其中 3 个是必需基因(表 1)。

2.6 Rv0164 结合 Rv3002c

Rv0164 的互作蛋白中,有 3 个是结核分枝杆菌生存必需的蛋白(Rv3002c、Rv1306 和 Rv3442c),仅 Rv3002c 有研究报道^[20]。酵母双杂交和 Pull down 验证 Rv0164 和 Rv3002c 的蛋白-蛋白相互作用。如图 6-A 所示,酵母菌能够在不含 Trp 和 Leu 的基本培养基上生长,说明 pGBKT7 或者其携带外源基因的重组质粒、pGADT7 或者其携带外源基因的重组质粒同时导入了酵母菌。当 pGBKT7

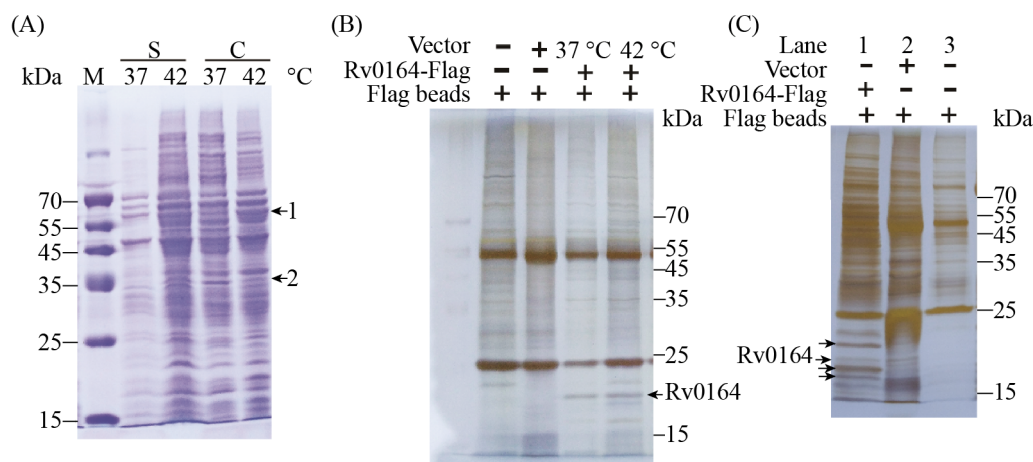


图 5. Co-IP 垂钓 Rv0164 互作蛋白

Figure 5. Co-immunoprecipitation (co-IP) of Rv0164 interacting proteins. A: Stationary bacterial cells of the strain *M. smegmatis* MC² 155/pMV261-Rv0164-FLAG was cultured at 37 °C or 42 °C for 3 hours; SDS-PAGE and Coomassie Blue Staining of culture supernatant (S) and cytoplasmic (C) proteins. B–C: Immunoprecipitation and silver staining of Flag-tagged Rv0164 from cell lysates; elution buffer was loading buffer (B) or glycine HCl (C). Rv0164-Flag and interacting protein candidates are labeled with an arrow in B and C.

表 1. Rv0164 互作蛋白
Table 1. Rv0164 interacting proteins

Sequence coverage/% (Twice)	kDa ¹	Sequence length ²	MSMEG ³	Product	Rv ⁴	Essential ⁵	Reference	
60.0	42.9	18.3	170	MSMEG_2373	Acetolactate synthase small subunit	Rv3002c	Yes	[20]
48.8	42.4	17.6	170	MSMEG_4940	ATP synthase B chain AtpF	Rv1306	Yes	NCBI
54.0	54.0	16.7	150	MSMEG_1557	30S ribosomal protein S9 RpsI	Rv3442c	Yes	NCBI
56.6	42.2	18.3	166	MSMEG_6913	Transcriptional regulatory protein	Rv0042c	No	NCBI
49.7	41.0	18.5	161	MSMEG_0636	Hypothetical protein	Rv0310c	No	NCBI
48.0	40.5	21.1	200	MSMEG_6082	Beta-carbonic anhydrase CanB	Rv3588c	No	NCBI
44.1	87.7	21.6	195	MSMEG_4891	Alkyl hydroperoxide reductase C protein AhpC	Rv2428	No	NCBI

1: Molecular weight. 2: Number of amino acid residues. 3: Gene number in *M. smegmatis*. 4: Gene number in *M. tuberculosis*. 5: Experiment data from [13].

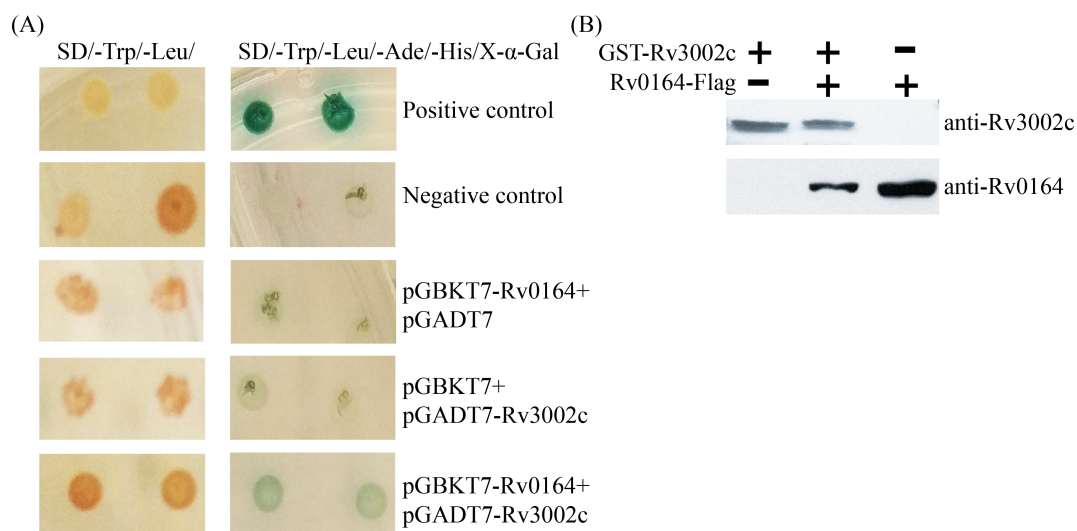


图 6. Rv0164 结合 Rv3002c

Figure 6. Interaction between Rv0164 and Rv3002c. A: Yeast Two-Hybrid; Positive control: pGBKT7-P53 + pGADT7-T; Negative control: pGBKT7-Lam + pGADT7-T. B: GST Pull down.

和 pGADT7 携带的外源基因发生蛋白相互作用时，激活报告基因的转录，产生 ADE2、HIS3 和 MEL1，使酵母菌能够在不含 Ade 和 His 的基本培养基上生长，酵母菌分泌的 MEL1 在含有底物 X-alpha-Gal 的培养基中使菌苔呈蓝色。阳性对照中 P53 和 SV40 large T-antigen 是已知的一组互作蛋白，重组酵母菌在蛋白互作筛选培养基上呈深蓝色。阴性对照中 Lamin 和 SV40 large T-antigen 是已知的非互作蛋白，重组酵母菌在蛋白互作筛

选培养基上无明显生长。pGBKT7 和 pGADT7 质粒仅携带 Rv0164 或者 Rv3002c 时，重组酵母菌在蛋白互作筛选培养基上无明显生长，说明 Rv0164 或者 Rv3002c 自身不能激活报告基因的转录。pGBKT7-Rv0164 和 pGADT7-Rv3002c 使重组酵母菌在蛋白互作筛选培养基上生长，菌苔呈淡蓝色，说明 Rv0164 和 Rv3002c 能够发生蛋白相互作用。

Pull down 检测中 GST 标签与柱材料的高亲

和力使融合蛋白 GST-Rv3002c 被固定在柱材料上, Rv3002 的互作蛋白通过蛋白-蛋白相互作用也将结合在柱材料上。如图 6-B 中间泳道, Pull down 样品的洗脱液中有 Rv0164 和 Rv3002, 而 2 个对照样品中仅检测到 Rv3002 (左侧泳道) 或者 Rv0164 (右侧泳道), 说明 Rv0164 和 Rv3002c 有相互作用。

3 讨论

结构生物学分析表明 Rv0164 同源蛋白是 START 家族的无酶活蛋白^[10]。NCBI 组学数据表明饥饿培养 24 h 和 96 h^[21]、感染小鼠巨噬细胞 24 h 以及双氧水处理 24 h 时结核分枝杆菌 Rv0164 表达量降低^[22], 说明 Rv0164 参与细菌胁迫应答。START 家族的主要作用机制是: (1) 作为脂质转运蛋白, 在真核细胞内的不同膜结构之间转运脂类物质^[23]; (2) 作为脂类感应蛋白, 一般为多结构域蛋白, 由 START 结构域结合脂类引起蛋白构象变化而激活其他结构域或者改变蛋白的细胞定位^[24]; (3) 聚酮环化酶活性^[5, 25]。仅脂类感应功能同时满足无酶活和参与胁迫应答的特性, 表明 Rv0164 可能参与脂类感应。

脂类感应需要信号的接收和传递, 一般由 2 个结构域执行。例如植物 HD-Zip 转录因子的 START 结构域结合配体后(即信号接收)调控其转录因子活性(即信号传递)^[4]。Rv0164 全长 161 个氨基酸, START 功能域覆盖 128 个氨基酸(第 25–152 位), 是单一结构域蛋白, 能够结合配体完成脂类感应的信号接收, 需要下游效应蛋白改变细菌的生理状态, 例如改变蛋白的数量和种类, 从而完成信号传递。Rv0164 是必需基因, 下游效应蛋白可能也是必需基因。Co-IP 方法垂钓 Rv0164

的相互作用蛋白(图 5), 7 个互作蛋白中有 3 个是必需基因, 分别属于蛋白质合成(MSMEG_2373 和 MSMEG_1557)和能量合成通路(MSMEG_4940), 说明上述 3 个必需基因可能作为 Rv0164 的下游效应蛋白。

尽管在细菌培养上清发现了 Rv0164, 尚无研究报告该蛋白是细菌主动排出或者由于细菌裂解而释放到胞外。分枝杆菌转运系统的底物特征是: (1) Sec 分泌系统, 分泌蛋白的 N 端有信号肽; (2) Twin-arginine transporter, 分泌蛋白的信号肽有 2 个精氨酸; (3) VII 型分泌系统, 分泌蛋白的 C 末端有 T7S motif (YXXXD/E)^[26–27]。SignalP 分析发现 Rv0164 无信号肽(图 2), Rv0164 也不具有上述分泌系统的特征序列。Western blotting 进一步证实 Rv0164 定位在胞内(图 3)。以上结果表明 Rv0164 是一个胞内蛋白。

综合数据库信息和本研究结果, 推测 Rv0164 的脂类感应作用机制是: 细菌面临环境压力时 Rv0164 接收信号, 通过蛋白互作影响下游效应蛋白, 下游效应蛋白调控胞内大分子数量, 使细菌适应环境变化。真核生物 START 家族蛋白的脂类感应功能通常由一个多结构域蛋白完成信号接收和传递, Rv0164 与下游效应蛋白组成的“双元件”体系使得不同的下游效应蛋白可能产生不同的调控效果, 值得进一步研究。

参考文献

- [1] Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(45): 28314–28322.
- [2] Wong LH, Čopič A, Levine TP. Advances on the transfer of

- lipids by lipid transfer proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 2017, 42(7): 516–530.
- [3] Iyer LM, Koonin EV, Aravind L. Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily. *Proteins*, 2001, 43(2): 134–144.
- [4] Schrick K, Bruno M, Khosla A, Cox PN, Marlatt SA, Roque RA, Nguyen HC, He CW, Snyder MP, Singh D, Yadav G. Shared functions of plant and mammalian StAR-related lipid transfer (START) domains in modulating transcription factor activity. *BMC Biology*, 2014, 12: 70.
- [5] Zhang Z, Pan HX, Tang GL. New insights into bacterial type II polyketide biosynthesis. *F1000Research*, 2017, 6: 172.
- [6] Stark JL, Mercier KA, Mueller GA, Acton TB, Xiao R, Montelione GT, Powers R. Solution structure and function of YndB, an AHSA1 protein from *Bacillus subtilis*. *Proteins*, 2010, 78(16): 3328–3340.
- [7] Zhang YL, Inouye M. RatA (YfjG), an *Escherichia coli* toxin, inhibits 70S ribosome association to block translation initiation. *Molecular Microbiology*, 2011, 79(6): 1418–1429.
- [8] Lim JH, Kim HJ, Lee KS, Jo EK, Song CH, Jung SB, Kim SY, Lee JS, Paik TH, Park JK. Identification of the new T-cell-stimulating antigens from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 232(1): 51–59.
- [9] Eweda G, Suzuki D, Nagata T, Tsujimura K, Koide Y. Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secretory proteins (CFP11, CFP17, and TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine*, 2010, 28(29): 4616–4625.
- [10] Zheng SP, Zhou Y, Fleming J, Zhou YF, Zhang MT, Li SL, Li HL, Sun BQ, Liu W, Bi LJ. Structural and genetic analysis of START superfamily protein MSMEG_0129 from *Mycobacterium smegmatis*. *FEBS Letters*, 2018, 592(8): 1445–1457.
- [11] Yuan TA, Sampson NS. Hit generation in TB drug discovery: from genome to granuloma. *Chemical Reviews*, 2018, 118(4): 1887–1916.
- [12] Zhang B, Li J, Yang XL, Wu LJ, Zhang J, Yang Y, Zhao Y, Zhang L, Yang XN, Yang XB, Cheng X, Liu ZJ, Jiang B, Jiang HL, Guddat LW, Yang HT, Rao ZH. Crystal structures of membrane transporter MmpL3, an Anti-TB drug target. *Cell*, 2019, 176(3): 636–648.e13.
- [13] Griffin JE, Gawronski JD, Dejesus MA, Ioerger TR, Akerley BJ, Sasseti CM. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(9): e1002251.
- [14] Roback P, Beard J, Baumann D, Gille C, Henry K, Krohn S, Wiste H, Voskuil MI, Rainville C, Rutherford R. A predicted operon map for *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(15): 5085–5095.
- [15] Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 2011, 8(10): 785–786.
- [16] Gomez M, Johnson S, Gennaro ML. Identification of secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis* by a bioinformatic approach. *Infection and Immunity*, 2000, 68(4): 2323–2327.
- [17] Blokpoel MCJ, Murphy HN, O’Toole R, Wiles S, Runn ESC, Stewart GR, Young DB, Robertson BD. Tetracycline-inducible gene regulation in mycobacteria. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(2): e22.
- [18] Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, Bansal GP, Young JF, Lee MH, Hatfull GF, Snapper SB, Barletta RG, Jacobs Jr WR, Bloom BR. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature*, 1991, 351(6326): 456–460.
- [19] Stokes RW. *Mycobacterium tuberculosis* Hsp60 as a key virulence factor in tuberculosis//Henderson B, Pockley AG. Cellular Trafficking of Cell Stress Proteins in Health and Disease. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012: 243–258.
- [20] Singh V, Chandra D, Srivastava BS, Srivastava R. Biochemical and transcription analysis of acetohydroxyacid synthase isoforms in *Mycobacterium tuberculosis* identifies these enzymes as potential targets for drug development. *Microbiology*, 2011, 157(1): 29–37.
- [21] Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(3): 717–731.
- [22] Schnappinger D, Ehrst S, Voskuil MI, Liu Y, Mangan JA, Monahan IM, Dolganov G, Efron B, Butcher PD, Nathan C, Schoolnik GK. Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: insights into the phagosomal environment. *The Journal of Experimental Medicine*, 2003, 198(5): 693–704.
- [23] Horenkamp FA, Valverde DP, Nunnari J, Reinisch KM. Molecular basis for sterol transport by StART-like lipid transfer domains. *The EMBO Journal*, 2018, 37(6): e98002.
- [24] Prashek J, Bouyain S, Fu MG, Li Y, Berkes D, Yao XL.

- Interaction between the PH and START domains of ceramide transfer protein competes with phosphatidylinositol 4-phosphate binding by the PH domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(34): 14217–14228.
- [25] Yao YP, Wang WS, Yang KQ. Efficient production of polyketide products in *Streptomyces* hosts—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(3): 418–428. (in Chinese) 姚永鹏, 王为善, 杨克迁. 链霉菌中高效生产聚酮化合物的研究方法及进展. *微生物学报*, 2016, 56(3): 418–428.
- [26] Champion PAD, Cox JS. Protein secretion systems in Mycobacteria. *Cellular Microbiology*, 2007, 9(6): 1376–1384.
- [27] Daleke MH, Ummels R, Bawono P, Heringa J, Vandenbroucke-Grauls CM, Luirink J, Bitter W. General secretion signal for the mycobacterial type VII secretion pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(28): 11342–11347.

Expression and protein interaction analysis of the START family protein Rv0164 in *Mycobacterium smegmatis*

Ying Zhou¹, Wenjing Wei², Baoyi Jiang¹, Jinshan Li³, Lijun Bi^{1,4*}

¹ Department of Biomedical Engineering, Foshan University, Foshan 528000, Guangdong Province, China

² Center for Tuberculosis Control of Guangdong Province, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

³ State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China

⁴ Key Laboratory of RNA Biology, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Objective] Mutations or abnormal expressions of START family proteins in mammals are the basis for diseases such as adrenal hyperplasia, breast cancer and colon cancer. START family proteins are key regulators of plant development. The mechanism of the essential START proteins in prokaryote is unclear. Rv0164 belongs to the START family and is an essential gene with unknown function in *Mycobacterium tuberculosis*. Therefore, exploring the function of Rv0164 will add a new theory to the molecular mechanisms of START family. [Methods] Bioinformatics method was used to analyze the sequence of Rv0164. Rv0164 was expressed in the model strain *Mycobacterium smegmatis* and analyzed the protein localization. The interaction proteins of Rv0164 were identified by Co-IP and mass spectrometry, then verified by yeast two hybrid and pull down. [Results] The N-terminal 17 residues of Rv0164 were not conserved in *Mycobacterium*. Rv0164 had no signal peptide. Rv0164 was localized in cytoplasm and regulated by some proteostasis mechanisms which were weaker in stationary phase than in logarithmic phase. Deletion of the N-terminus of Rv0164 produced protein instability in both stationary phase and logarithmic phase. Rv0164 interacted with several cytosolic proteins. [Conclusion] The N-terminus of Rv0164 enhances protein stability. Rv0164 localizes in cytoplasm and can bind essential proteins.

Keywords: START family, Rv0164, protein localization, protein-protein interaction

(本文责编: 李磊)

Supported by the Start-Up Research Project of Foshan University

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64888464; E-mail: blj@sun5.ibp.ac.cn

Received: 5 May 2019; Revised: 7 July 2019; Published online: 19 November 2019