



研究报告

短短芽孢杆菌 GZDF3 中 PilZ 结构域基因的挖掘和糖基转移酶的原核表达

贾化可^{1,2} 张功友^{1,2} 陶小买^{1,2} 吴东明¹ 隆耀航^{1,2,3} 刘红美^{*1,2,3}

1 贵州医科大学医药生物技术与工程研究中心 贵州 贵阳 550025

2 贵州医科大学生物与医学工程重点实验室 贵州 贵阳 550025

3 贵州省免疫细胞与抗体工程研究中心 贵州 贵阳 550025

摘要:【背景】PilZ 结构域是最早发现的环二鸟苷酸(Cyclic diguanylate, c-di-GMP)受体信号分子,与 c-di-GMP 结合后可以调控目标基因或者蛋白的活性,在细菌的生长过程中发挥着至关重要的作用,而短短芽孢杆菌中 PilZ 结构域的研究相对缺乏。【目的】挖掘短短芽孢杆菌 GZDF3 菌株中的 PilZ 结构域蛋白基因,并进行重组表达,为研究其功能奠定基础。【方法】从 Pfam 数据库中下载 PilZ 结构域模型, HMMScan 软件扫描 GZDF3 全基因组序列,在保守结构域数据库(Conserved domain database, CDD)中分析蛋白保守结构域, Protein BLAST 比对分析;采用 ExPASy 在线软件预测蛋白的基本理化性质;构建重组表达载体进行蛋白重组表达。【结果】GZDF3 基因中存在 5 个含有 PilZ 结构域的蛋白编码基因,其中命名为 *Gene4836* 的基因经 Protein BLAST 比对分析显示其编码糖基转移酶, *Gene1423* 为 YcgR 超家族蛋白编码基因, *Gene1723* 编码透明质酸合成酶,属于糖基转移酶超家族 2,其余 *Gene2571*、*Gene2956* 编码假定蛋白; *Gene4836* 的编码产物分子量为 24.08 kD,等电点为 6.39,为酸性亲水性蛋白;C 端有一个 PilZ 结构域;0.5 mmol/L 乳糖诱导、30 °C 培养 20 h,表达出一大小约为 25 kD 的重组蛋白,与生物信息学预测结果相符。【结论】首次对短短芽孢杆菌含有 PilZ 结构域蛋白编码基因进行原核表达,并成功纯化出重组蛋白,为后续研究其功能奠定了基础。

关键词: 短短芽孢杆菌, PilZ 结构域, 糖基转移酶, 原核表达, 重组蛋白

Foundation items: Guiyang Joint Fund ([2017] 5-33); Key Technology Research and Development Program of the Department of Science and Technology of Guizhou Province ([2017] 2833)

***Corresponding author:** E-mail: hmLiu@gmc.edu.cn

Received: 18-03-2019; **Accepted:** 08-05-2019; **Published online:** 19-06-2019

基金项目: 贵阳市联合基金([2017] 5-33); 贵州省科技厅科技支撑计划([2017] 2833)

***通信作者:** E-mail: hmLiu@gmc.edu.cn

收稿日期: 2019-03-18; **接受日期:** 2019-05-08; **网络首发日期:** 2019-06-19

Mining gene with PilZ domain and prokaryotic expression of glycosyltransferase of *Brevibacillus brevis* GZDF3

JIA Hua-Ke^{1,2} ZHANG Gong-You^{1,2} TAO Xiao-Mai^{1,2} WU Dong-Ming¹
LONG Yao-Hang^{1,2,3} LIU Hong-Mei^{*1,2,3}

1 Guizhou Medical University, Center for Biotechnology and Engineering Research in Medicine, Guiyang, Guizhou 550025, China

2 Guizhou Medical University, Key Laboratory of Biological and Medical Engineering, Guiyang, Guizhou 550025, China

3 Guizhou Immunology Cell and Antibody Engineering Research Center, Guiyang, Guizhou 550025, China

Abstract: [Background] PilZ domain is the earliest discovered cyclic diguanylate (c-di-GMP) receptor signaling molecule, regulates the activity of the target gene or protein after binding to c-di-GMP, and plays a vital role in the growth of bacteria. However, the study of PilZ domain in *Brevibacillus brevis* is a relative deficiency. [Objective] To mine the gene of PilZ domain in *Brevibacillus brevis* GZDF3 strain and construct the recombinant expression system for further research. [Methods] The PilZ domain model was downloaded from the Pfam database. HMMScan software was adopted to scan the genome of GZDF3 strain. Protein conserved domains were analyzed in Conserved Domain Database (CDD). The product of protein was predicted by protein BLAST. The physical and chemical properties of the protein were determined by online bioinformatics analysis softwares in ExPASy website. The recombinant expression vector of the gene was constructed to obtain recombinant protein. [Results] Five genes coding protein containing PilZ domain were discovered in GZDF3 genome. The gene named as *Gene4836* encoded a glycosyltransferase by homology analysis. *Gene1423* was a protein-coding gene of YcgR superfamily and *Gene1723* encoded hyaluronan synthase belonged to glycosyltransferase superfamily 2. The other two genes *Gene2571* and *Gene2956* encoded hypothetical proteins. The result of bioinformatics analysis suggested that the molecular weight of the product of *Gene4836* was 24.08 kD, and the isoelectric point was 6.39. It was an acidic hydrophilic protein. A conserved PilZ domain was found in the C end of the protein of *Gene4836*. The optimal expression condition was 0.5 mmol/L lactose for 20 h at 30 °C. A recombinant protein about 25 kD was detected by SDS-PAGE electrophoresis, consistent with the result of bioinformatics analysis. [Conclusion] It is the first report for recombinant expression protein with PilZ domain in *Brevibacillus brevis*. It would provide a foundation for further study of the PilZ domain function.

Keywords: *Brevibacillus brevis*, PilZ domain, Glycosyltransferase, Prokaryotic expression, Recombinant protein

环二鸟苷酸(Cyclic diguanylate, c-di-GMP)是普遍存在于细菌中的第二信使, 参与调节细菌的运动性、生物膜的形成、细胞周期和毒力等生命活动过程^[1]。c-di-GMP 信号受体类型多样, 包括转录调控因子、结构域蛋白、核糖体开关、多核苷酸磷酸化激酶和新发现的蛋白激酶等^[2]。c-di-GMP 响应性效应蛋白的一个主要结构域是含有 C 末端的 PilZ 结构域, 与 c-di-GMP 结合时构象发生变化, 导致蛋白与蛋白间的相互作用和变构效应的改变^[3-4], 两者主要通过 PilZ 结构域上保守的基序 RXXXXR 和 D/NXSXXG 结合^[5-6]。

PilZ 结构域是最早发现可与 c-di-GMP 结合的结构域, 最终从铜绿假单胞菌中鉴定出来并命名为 PilZ 结构域, 通常为 β 桶状折叠形式, 含有两个保守基序^[7], 广泛分布在细菌基因组中, 并且细菌基因组通常编码一个或多个 PilZ 结构域蛋白^[8], PilZ 结构域通常作为独立结构域或多结构域蛋白的一部分出现^[9]。

PilZ 结构域的研究成为近年来细菌研究方面的热点之一。许多 PilZ 结构域蛋白已在不同细菌中被鉴定, 分别具有不同的功能, 主要涉及细菌的运动性、多糖的合成、生物膜的形成及细菌毒力

的调节^[8]。大肠杆菌和沙门氏菌中含有 PilZ 结构域的蛋白 YcgR 在高水平 c-di-GMP 中直接与鞭毛运动元件结合,从而降低细菌的泳动速度,使细菌由浮游状态转变为静止状态,有利于生物膜的形成^[10-12]。在枯草芽孢杆菌中有证据表明 YcgR 的同源物 YpfA (现称 DgrA)与鞭毛运动马达蛋白 MotA 相互作用^[13]。PilZ 结构域蛋白 PilZ_{XAC1133} 和 PilB ATP 酶形成复合物后,促进 T4P 复合物的形成,抑制柑橘溃疡病菌的滑动运动^[14]。铜绿假单胞杆菌中含 PilZ 结构域的蛋白 FlgZ 与高水平的 c-di-GMP 结合,在多糖产物 Pel 的协同作用下可抑制菌体的群集运动^[15]。伯氏疏螺旋体中含有 PilZ 结构域的蛋白 PlzA 和 PlzC 与 c-di-GMP 结合后可触发结构重组,从而起到功能转换的作用,而 PlzA 的缺失会导致异常的运动模式并减弱或消除伯氏疏螺旋体的感染性^[4]。绿脓杆菌中包含一个 PilZ 结构域的 Alg44 是由操纵子 *alg* 编码的内膜蛋白,可与 c-di-GMP 结合,而 Alg44 等位基因编码的 Alg44 蛋白则不能与 c-di-GMP 结合,也不能产生海藻酸钠,表明海藻酸盐的生物合成需要 Alg44 与 c-di-GMP 的结合^[16-17]。假单胞菌中的一种鞭毛基因 *flgZ*,编码一种 PilZ 结构域蛋白,调节假单胞菌的运动状态和生物膜形成^[18]。因此,研究 PilZ 结构域蛋白对于我们从更多方面了解细菌的生命活动规律具有重要的意义。

目前,关于 PilZ 结构域在短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*) c-di-GMP 调控中的研究尚未报道,因此挖掘短短芽孢杆菌基因组中的 PilZ 结构域,获得纯度较高的含 PilZ 结构域的蛋白,并对其生物物理性质以及结构的分析,对于进一步确定该蛋白的结构及结合 c-di-GMP 调节细菌生长状态的机制研究是非常有必要的,同时也能对短短芽孢杆菌的进一步开发利用提供新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis* GZDF3)、大

肠杆菌[*Escherichia coli* BL21(DE3)]均保存于贵州医科大学医药生物技术工程研究中心;原核表达质粒 pET-28a 由贵州医科大学生物与工程学院王兵副教授惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器

DNA Marker、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 购自宝日医生物技术(北京)有限公司(TaKaRa 中国);蛋白质预染 Marker 购自北京索莱宝科技有限公司;DNA 高保真聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司;细菌全基因组试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒和质粒小提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;引物的合成和质粒的测序由深圳华大基因完成;Ni-NTA His Bind Resin 镍柱购自上海七海复泰生物科技有限公司。

PCR 仪,ABI 公司;琼脂糖电泳仪、凝胶成像系统,Bio-Rad 公司。

1.1.3 主要软件及操作平台

操作平台:Windows 系统操作平台、Linux 系统操作平台。

分析软件: BioEdit (V7.0.9)、HMMER (V3.1b2)、MEGA X。

主要网站: ExPASy (<https://www.expasy.org/>); NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

1.2 GZDF3 中含 PilZ 结构域的蛋白编码基因预测及保守结构域分析

1.2.1 GZDF3 中含 PilZ 结构域的蛋白编码基因预测

从 Pfam 数据库下载 PilZ 结构域蛋白质家族模型并进行格式化,用华大基因公司测序、SOAPdenovo (V2.04)组装、Genemark 注释后的 GZDF3 全基因组序列^[19]作为输入序列,在该蛋白质家族模型数据库中通过 HMMScan 进行搜索比对,确定 GZDF3 中含有 PilZ 结构域的蛋白编码基因。

1.2.2 基因保守结构域分析

登录 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站,通过 Protein BLAST 比对分析各候选基因的编码产物;在保守结构域数据库(Conserved domain database, CDD)中通过 CD-Search 分析该蛋白氨基酸序列保

守结构域。

1.3 蛋白基本性质分析

登录蛋白质专家分析系统(ExPASy, <https://www.expasy.org/>), 通过 ProtParam 分析该序列的等电点(pI)、相对分子质量(Molecular weight, MW)、亲疏水性、跨膜区等基本性质, 通过 SOPMA 分析该蛋白的二级结构特征; 通过 SignalP-5.0 Server 预测该蛋白质的信号肽。

1.4 系统发育树构建及高级结构分析

通过 NCBI 下载其他菌株含有 PilZ 结构域的蛋白质序列 *Brevibacillus brevis* NBRC 110488 (登录号为 WP 069846830.1)、*Brevibacillus brevis* X23 (登录号为 WP 017250036.1)、*Brevibacillus brevis* DZQ 7 (登录号为 WP 048031333.1)、*Brevibacillus brevis* NBRC 100599 (登录号为 WP 012684654.1)、*Brevibacillus brevis* ATCC 35690 (登录号为 WP 087342889.1)、*Brevibacillus brevis* NCTC 3000 (登录号为 WP_106654172.1), 选用 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (登录号为 AEE34679.1) 作外群, 使用软件 MEGA X 进行多序列比对, 使用邻接法(Neighbor-Joining, NJ), Bootstrap 值为 1 000, 构建系统发育树, 分析不同菌株中含 PilZ 结构域蛋白的进化关系; 通过 SWISS-MODEL 分析蛋白的结构。

1.5 该编码基因的克隆及原核表达载体的构建

用细菌全基因组提取试剂盒提取过夜培养的短短芽孢杆菌的总 DNA, 并以总 DNA 为模板, 以引物 5'-CCCAAGCTTAGAACGCAGATG-3' (下划线为 Hind III 酶切位点) 和 5'-CCGCTCGAGGAACC AATTAAAC-3' (下划线为 Xho I 酶切位点) 扩增目标基因。PCR 反应体系(30 μ L): 10 \times Buffer 3 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 2 μ L, 模板 DNA (约 200 ng) 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 1 μ L, 高保真酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L, 双蒸水 21.75 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。用 DNA 产物纯化回收试剂盒回收 PCR 产物, 并用限制性内切酶 Hind III 和 Xho I 进行双酶切, 纯化后连接到

pET-28a 表达载体上, 转化 *Escherichia coli* BL21(DE3)感受态细胞, 将菌体涂布于含 10 μ g/mL Kan^r 的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取单菌落做菌落 PCR, 选择阳性结果的克隆抽提质粒并进行双酶切验证, 取双酶切验证正确的阳性克隆送至华大基因测序, 进一步确定插入的目的基因序列是否正确。

1.6 重组蛋白的诱导表达及纯化

1.6.1 重组蛋白的诱导表达

将培养过夜的细菌按 1%接种量分别接种至 30 mL 含 10 μ g/mL Kan^r 的 LB 液体培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5–0.6 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的乳糖溶液, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 下分别诱导 4、8、20 h, 然后 4 $^{\circ}$ C、6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体和菌液上清备用, 加入等体积的 PBS 重悬菌体, 4 $^{\circ}$ C、6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 重复此步骤 1–2 次, 加入预冷的 PBS 重悬菌体后进行超声破碎(300 W, 工作 5 s, 间隔 5 s, 共 30 min), 破碎后的菌液在 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 15 min, 收集破碎后上清。12% SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色, 确定最佳表达时间。

1.6.2 重组蛋白的分离纯化

将 1.6.1 获得的最佳表达条件进行重组蛋白的大量表达。在 4 $^{\circ}$ C、6 000 r/min 离心 10 min 收集诱导表达后的菌体, 重悬于 30 mL 的 PBS 中, 再次离心收集菌体, 重复此步骤 1–2 次, 加入预冷的 PBS 重悬菌体, 在冰浴中超声破碎(300 W, 工作 5 s, 间隔 5 s, 共 30 min), 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 下离心 15 min, 收集破碎后上清备用。通过 Ni-NTA His Bind Resin 镍柱对上清中的目的蛋白进行纯化, 将收集的蛋白样品用 12% SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色, 检验蛋白的纯化效果。

2 结果与分析

2.1 含有 PilZ 结构域的蛋白编码基因预测及保守结构域分析

以下载的 PilZ 结构域模型作为蛋白数据库, 用 HMMScan 软件扫描短短芽孢杆菌 GZDF3 全基

基因组,发现 GZDF3 中含有 PilZ 结构域的蛋白编码基因一共有 5 个,分别命名为 *Gene1423*、*Gene1723*、*Gene2571*、*Gene2956*、*Gene4836*。Protein BLAST 分析显示,*Gene1423* 编码产物属 YcgR 蛋白超家族,与鞭毛开关复合蛋白 FliG 和 FliM 相互作用,调节细菌的运动;*Gene1723* 编码 I 类透明质酸合成酶,属于糖基转移酶超家族 2,其功能结构相对保守^[20]; *Gene2571*、*Gene2956* 编码产物为假定蛋白, *Gene4836* 编码产物为糖基转移酶; CD-Search 结果表明, *Gene4836* 编码的氨基酸序列 C 端含有 1 个 PilZ 保守结构域(登录号为 WP_064202322.1)。

2.2 蛋白基本性质分析

ProtParam 分析显示 *Gene4836* 编码产物糖基转移酶的氨基酸长度为 206 aa; 分子量为 24.08 kD; 等电点为 6.39, 为酸性蛋白; 在水溶液中不稳定, 不稳定指数为 53.93; 通过 ProtScale 分析, Score>0 表示疏水, Score<0 表示亲水, 亲水性区域大于疏水性区域, 总平均亲水性为-0.336, 表明该糖基转移酶为亲水性蛋白(图 1A); 通过 Tmpred 分析, 在第 107-125 位氨基酸之间存在一个跨膜区(图 1B), TM-螺旋长度在 17-33 之间; 通过 SOPMA 分析, 糖基转移酶的二级结构中延伸链(Extended strand)占 33.98%, α -螺旋(Alpha helix)占 17.48%, β -折叠(Beta

turn)占 8.25%, 无规则卷曲(Random coil)占 40.29%。

2.3 系统发育树构建及高级结构分析

将 8 条含有 PilZ 结构域的蛋白质同源编码氨基酸序列和拟南芥的限制性核酸内切酶氨基酸序列进行多序列比对, 选用邻接法(Neighbor-Joining, NJ), Bootstrap 值为 1 000, 构建系统发育树如图 2 所示, 短短芽孢杆菌 GZDF3 与 ATCC35690 一致性较高, 而其他几株短短芽孢杆菌相似性相对较高; 对短短芽孢杆菌 GZDF3 和 ATCC35690 菌株中该蛋白的氨基酸序列进行比较分析, 发现在 28 位氨基酸处发生丙氨酸和缬氨酸的相互替换, 两者一致性达到 99.52% (图 3A); 在 SWISS-MODEL 网站上以该蛋白相似性较高的蛋白 5vx6.1.A 为模板通过同源建模的方法, 最终预测出两种蛋白质的三级结构图(图 3B), 可以发现虽然其序列的相似性较高, 但在空间结构上存在明显的差异, 其中 *Gene4836* 蛋白序列首端区域有大约 30 个氨基酸(包括 28 位的丙氨酸)未参与建模, 而 PilZ_{ATCC35690} 只有 5 个氨基酸未参与建模, 从图 3B(1)中可以看出 β 折叠的数量明显减少, 说明 28 位氨基酸的替换对其空间结构可能具有很重要的影响, 图 3B(2)中红色箭头指出位置是 PilZ_{ATCC35690} 蛋白序列第 28 位氨基酸缬氨酸, 而该 28 位氨基酸造成的空间结构差异的最终原因有待于后续实验进行深入的研究。

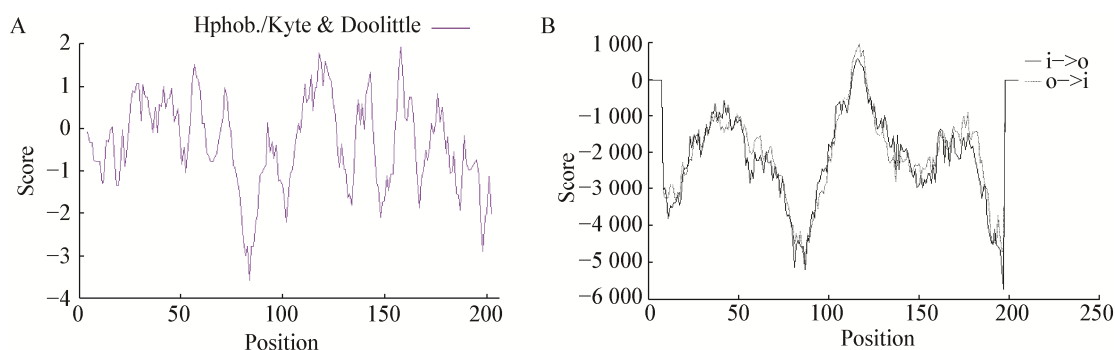


图 1 糖基转移酶亲水性/疏水性分析和跨膜区预测

Figure 1 Hydrophilicity/hydrophobicity analysis and membrane-spanning regions prediction of glycosyltransferases

注: A: 糖基转移酶亲水性/疏水性分析; B: 糖基转移酶跨膜区分析。i->o 表示从膜内到膜外, o->i 表示从膜外到膜内。

Note: A: Hydrophilicity/hydrophobicity analysis of glycosyltransferase; B: Membrane-spanning regions analysis of glycosyltransferases. i->o indicates from inside to outside of the membrane and o->i indicates from outside to inside of the membrane.

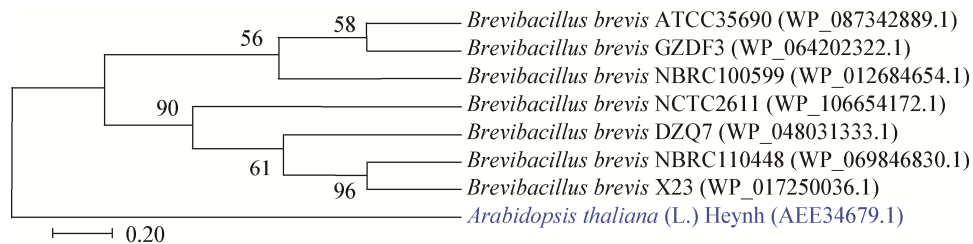


图 2 Gene4836 的系统进化树

Figure 2 Phylogenetic trees of Gene4836

注: 括号内为相应基因序列在 GenBank 中的登录号; 分支点上的数值为 1 000 次 Bootstrap 分析所得值。

Note: The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the corresponding gene sequences of those reference strains; Bootstrap values based on 1 000 replications are shown at branch nodes.

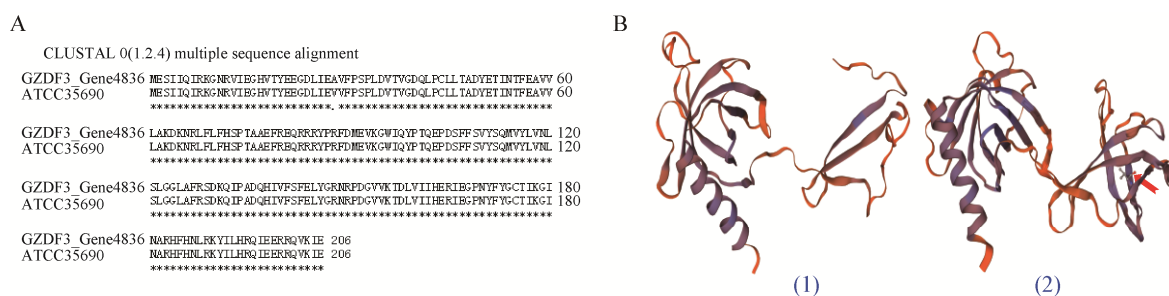


图 3 Gene4836 和 PilZATCC35690 的氨基酸序列分析及高级结构预测

Figure 3 Amino acid sequence alignment and advanced structure prediction of Gene4836 and PilZ_{ATCC35690}

注: A: Gene4836 和 PilZ_{ATCC35690} 的氨基酸序列分析. B: Gene4836 和 PilZ_{ATCC35690} 的高级结构预测, (1): 蛋白 Gene4836; (2): 同源蛋白 PilZ_{ATCC35690}.

Note: A: Amino acid sequence analysis of Gene4836 and PilZ_{ATCC35690}. B: Advanced structure prediction of Gene4836 and PilZ_{ATCC35690}, (1): Protein Gene4836; (2): Homologous protein PilZ_{ATCC35690}.

2.4 Gene4836 的 PCR 扩增及重组载体的鉴定

以短短芽孢杆菌 GZDF3 总 DNA 为模板, 用 PCR 扩增 Gene4836 目的片段, 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测发现扩增产物的大小与理论值 (670 bp) 一致 (图 4), 显示获得目的条带, 可用于后续实验。对构建的重组表达载体克隆进行大量培养, 提取重组质粒, 用限制性内切酶 Hind III 和 Xho I 进行双酶切鉴定 (图 5), 电泳结果显示酶切出一大小为 670 bp 的插入片段, 进一步阳性重组子的测序结果也表明重组质粒构建成功, 可用于下一步诱导表达。

2.5 糖基转移酶的诱导表达

前期预实验表明, 重组蛋白在细胞质中以可溶性形式表达; 收集乳糖诱导表达 4、8、20 h 的菌液上清以及每个时间段菌体破碎后的上清备

用, 利用该融合蛋白的 His 标签, 用 Ni-NTA His Bind Resin 镍柱进行纯化, 取纯化后的样品和备用样品进行 SDS-PAGE 检测, 结果如图 6 所示, 在 25 kD 左右处具有明显的条带, 与该融合蛋白的理论大小 (24.08 kD) 相符。

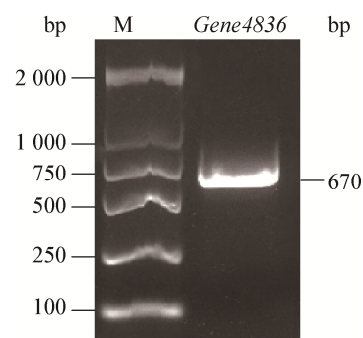


图 4 Gene4836 基因的 PCR 扩增结果

Figure 4 Production of Gene4836 gene amplified by PCR

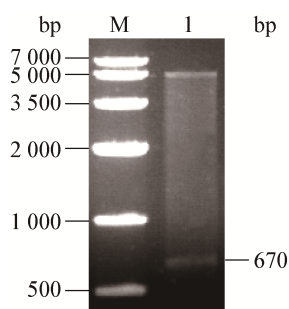


图5 重组质粒 pET-28a-Gene4836 的双酶切结果

Figure 5 Double enzyme digestion results of recombinant plasmid pET-28a-Gene4836

注: M: DL2000 DNA 标准条带; 1: 双酶切结果.

Note: M: DL2000 DNA marker; 1: The results of double enzyme digestion.

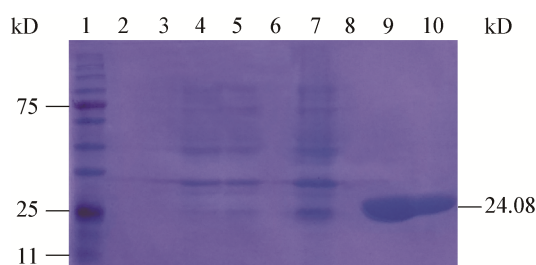


图6 SDS-PAGE 分析原核表达产物蛋白

Figure 6 SDS-PAGE analysis of prokaryotic expression product protein

注: 1: 预染的蛋白质标准条带; 2: 未诱导的菌液上清; 3: 未诱导的细菌菌体; 4: 诱导 4 h 破碎离心后的上清; 5: 诱导 8 h 破碎离心后的上清; 6: 诱导 20 h 的菌液上清; 7: 诱导 20 h 破碎离心后的上清; 8: 洗脱的杂蛋白; 9、10: 纯化的目的蛋白.

Note: 1: Prestained protein marker; 2: Supernatant of uninduced bacterial fluid; 3: Uninduced bacteria (thallus); 4: The supernatant obtained by centrifugation after induced for 4 h; 5: The supernatant obtained by centrifugation after induced for 8 h; 6: Bacterial supernatant induced for 20 h; 7: The supernatant obtained by centrifugation after induced for 20 h; 8: Other proteins eluted; 9, 10: The purified target protein.

3 讨论与结论

短短芽孢杆菌 GZDF3 是分离于贵州省大方县半夏种植基地根际土壤, 对半夏块茎腐烂病原菌有强抑制作用。短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*) 属革兰氏阳性菌, 普遍存在于土壤中, 具有广泛的生防潜力, 可作为生防型菌肥、植物保鲜剂等^[21]。PilZ 结构域蛋白广泛存在于细菌全基因组中, 通过与细菌第二信使 c-di-GMP 结合调控细菌的运动状态、生物膜形成、细胞分裂和毒力等生命活

动过程, 在细菌的生长过程中具有重要作用^[2]。

本研究以 GZDF3 全基因组序列为对象, 在 Pfam 数据库中下载 PilZ 结构域家族模型, 使用 HMMScan 对 GZDF3 基因组序列进行搜索比对, 发现 5 个含有 PilZ 结构域的蛋白编码基因, 将 5 个编码基因进行 BLAST 比对, 确定 *Gene1423* 编码产物为 YcgR 蛋白超家族, 与鞭毛开关复合蛋白 FliG 和 FliM 相互作用, 调节细菌的运动; *Gene1723* 编码 I 类透明质酸合成酶, 属于糖基转移酶超家族 2, 其功能结构相对保守^[20], 通常是一类依赖脂质的完整的膜蛋白; *Gene2571*、*Gene2956* 编码产物为假定蛋白, *Gene4836* 编码产物为糖基转移酶。糖基转移酶(Gtfs)在生物体内催化活化的糖连接到不同的受体分子, 在抗生素生物合成基因簇中已经发现了很多编码糖基转移酶的基因^[22], 它的功能是在抗生素生物合成的后期使其糖基化, 通过糖的位置、类型和数量的改变对抗生素的活性进行调节, 这大大增加天然产物的结构多样性^[23], 将活性糖基从供体转移到受体(小分子化合物), 从而改变这些化合物的生物化学性质^[24], 具有重要的研究意义。

由于 *Gene1423* 属于 YcgR 蛋白超家族, 通常参与调节细菌的运动状态, 功能相对保守^[11]; *Gene1723* 为糖基转移酶超家族 2 中的 I 类透明质酸合成酶, 一般为依赖脂质的完整的膜蛋白, 在磷脂基团的辅助下可独立完成糖基的转移和加成, 其作用机制比较明确^[20]; 而 *Gene4836* 为功能未明确的糖基转移酶。为此, 我们采用 ExPASy 中的生物信息学软件进行生物信息学分析, 结果该蛋白为酸性亲水性蛋白, 在水溶液中不稳定, 存在一个明显的跨膜区, 推测可能为细菌中的一个膜锚定蛋白, 通过与 c-di-GMP 结合行使调节催化功能。二级结构中含有延伸链(Extended strand)、 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲, 没有信号肽。系统发育树表明, 该糖基转移酶与短短芽孢杆菌 ATCC35690 中相应的蛋白具有同源性, 有可能行使相近的功能。在碳水化合物活性酶数据库(CAZY)中未找到与之相似的蛋白, 推测其可能是一种还未分类的糖

基转移酶; 经 UniProt 数据库比对分析发现, 其 C 端的 PilZ 结构域可能与鞭毛运动的开关蛋白 FliG 和 FliM 相互作用, 进而影响鞭毛的旋转运动。

随后, 以 GZDF3 基因组为模板, 以 pET-28a 为载体构建含有 His 标签的重组质粒。将该重组质粒转入 *E. coli* BL21(DE3) 中, 取阳性克隆进行培养, 在 OD_{600} 为 0.5、0.5 mmol/L 乳糖、30 °C、200 r/min 条件下诱导表达该糖基转移酶, 经菌体破碎离心, 使用 Ni-NTA His Bind Resin 镍柱进行纯化, 再经 SDS-PAGE 检验, 表明已获得纯度较高的糖基转移酶, 为后续蛋白质的结构与功能的研究奠定基础。由于该糖基转移酶同时含有 PilZ 结构域, 在本研究结果的基础上, 接下来有必要通过该基因突变体的构建等方法对其在菌株体内的作用机制做深入研究。

REFERENCES

- [1] Römling U, Galperin MY, Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2013, 77(1): 1-52
- [2] Yang FH, Tian F, Chen HM, et al. Cyclic di-GMP signal receptor-mediated regulation of bacterial behaviors[J]. *Plant Protection*, 2017, 43(1): 9-14 (in Chinese)
杨凤环, 田芳, 陈华民, 等. 病原细菌受体介导的 c-di-GMP 信号传导及其调控机制[J]. *植物保护*, 2017, 43(1): 9-14
- [3] Wirebrand L, Österberg S, López-Sánchez A, et al. PP4397/FlgZ provides the link between PP2258 c-di-GMP signalling and altered motility in *Pseudomonas putida*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 12205
- [4] Kostick-Dunn JL, Izac JR, Freedman JC, et al. The *Borrelia burgdorferi* c-di-GMP binding receptors, PilA and PilB, are functionally distinct[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 213
- [5] Amikam D, Galperin MY. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(1): 3-6
- [6] Benach J, Swaminathan SS, Tamayo R, et al. The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains[J]. *The EMBO Journal*, 2007, 26(24): 5153-5166
- [7] Zhou E, Seminara AB, Kim SK, et al. Thiol-benzo-triazoloquinazolinone inhibits Alg44 binding to c-di-GMP and reduces alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *ACS Chemical Biology*, 2017, 12(12): 3076-3085
- [8] Yang F, Tian F, Chen H, et al. The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PilZ domain proteins function differentially in cyclic di-GMP binding and regulation of virulence and motility[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(13): 4358-4367
- [9] Schäper S, Steinchen W, Krol E, et al. AraC-like transcriptional activator CuxR binds c-di-GMP by a PilZ-like mechanism to regulate extracellular polysaccharide production[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(24): E4822-E4831
- [10] Boehm A, Kaiser M, Li H, et al. Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity[J]. *Cell*, 2010, 141(1): 107-116
- [11] Paul K, Nieto V, Carlquist WC, et al. The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "Backstop Brake" mechanism[J]. *Molecular Cell*, 2010, 38(1): 128-139
- [12] Pultz IS, Christen M, Don Kulasekara H, et al. The response threshold of *Salmonella* PilZ domain proteins is determined by their binding affinities for c-di-GMP[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 86(6): 1424-1440
- [13] Chen Y, Chai YR, Guo JH, et al. Evidence for cyclic di-GMP-mediated signaling in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(18): 5080-5090
- [14] Mahdavi J, Royer PJ, Sjölander HS, et al. Pro-inflammatory cytokines can act as intracellular modulators of commensal bacterial virulence[J]. *Open Biology*, 2013, 3(10): 130048
- [15] Baker AE, Diepold A, Kuchma SL, et al. PilZ domain protein FlgZ mediates cyclic di-GMP-dependent swarming motility control in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(13): 1837-1846
- [16] Merighi M, Lee VT, Hyodo M, et al. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Molecular microbiology*, 2007, 65(4): 876-895
- [17] Whitney JC, Whitfield GB, Marmont LS, et al. Dimeric c-di-GMP is required for post-translational regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(20): 12451-12462
- [18] Martínez-Granero F, Navazo A, Barahona E, et al. Identification of flgZ as a flagellar gene encoding a PilZ domain protein that regulates swimming motility and biofilm formation in *Pseudomonas*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e87608
- [19] Li YQ, Ye YN, Tao XM, et al. Analysis of codon bias in whole genome of *Brevibacillus brevis* GZDF3[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(12): 5187-5190 (in Chinese)
李玉权, 叶远浓, 陶小买, 等. 短短芽孢杆菌 GZDF3 全基因组密码子偏好性分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(12): 5187-5190
- [20] Weigel PH. Functional characteristics and catalytic mechanisms of the bacterial hyaluronan synthases[J]. *IUBMB Life*, 2002, 54(4): 201-211
- [21] Ma YQ, Wei C, Mao ZC, et al. Effects of bioorganic fertilizers with compound microbes on cucumber and root-knot nematode[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(15): 2945-2954 (in Chinese)
马玉琴, 魏偲, 郝振川, 等. 生防型菌肥对黄瓜生长及根结线虫病的影响[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(15): 2945-2954
- [22] Thoroson JS, Hoster TJ Jr, Jiang JQ, et al. Natures carbohydrate chemists the enzymatic glycosylation of bioactive bacterial metabolites[J]. *Current Organic Chemistry*, 2001, 5(2): 139-167
- [23] Weymouth-Wilson AC. The role of carbohydrates in biologically active natural products[J]. *Natural Product Reports*, 1997, 14(2): 99
- [24] Lao J, Oikawa A, Bromley JR, et al. The plant glycosyltransferase clone collection for functional genomics[J]. *The Plant Journal*, 2014, 79(3): 517-529