

沙门氏菌效应蛋白 SopB 288 ~ 309 肽段介导 SopB 依赖的 HeLa 细胞 AKT 的磷酸化研究

李 晔, 张西轩, 阮海华* (天津市食品生物技术重点实验室, 生物技术与食品科学学院, 天津 300134)

摘要 [目的] 研究沙门氏菌效应蛋白 SopB 中跨膜疏水结构域 288-309 肽段对受 SopB 诱导的 HeLa 细胞 Akt 磷酸化激活中的功能。[方法] 通过重叠延伸 PCR 的方法构建 SopB 第 288~309 位肽段缺失突变基因, 并将该基因在 HeLa 细胞中进行异位表达, 与野生型 SopB 基因进行比较, 确定缺失的第 288~309 位间肽段在受 SopB 诱导的 Akt 磷酸化激活中的作用。[结果] 与空载体对照相比较, 在 HeLa 细胞中表达野生型 SopB 重组质粒明显激活了 pAkt₄₇₃ 的磷酸化, 而在 HeLa 细胞中表达 SopB 缺失突变体 SopB^{Δ288-309} 时, 则检测不到 pAkt₄₇₃ 的磷酸化激活。[结论] SopB 表达激活 HeLa 细胞 pAkt₄₇₃ 的磷酸化与其第 288~309 位肽段的功能直接相关, 该跨膜疏水结构域的缺失导致 SopB 蛋白不能亚细胞定位至细胞膜, 从而导致 SopB^{Δ288-309} 对 pAkt₄₇₃ 磷酸化激活功能的丧失。

关键词 沙门氏菌属; SopB; AKT 的磷酸化

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)03-00660-03

The 288-309 Peptide of SopB Mediates the SopB-dependent AKT Phosphorylation in HeLa Cells

LI Ye et al (Tianjin Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, College of Biotechnology & Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134)

Abstract [Objective] To investigate the hydrophobic membrane spanning domain 288-309 peptide in the sequence of SopB that related to the SopB-dependent activation and phosphorylation of Akt in HeLa cells. [Method] The SopB^{Δ288-309} mutant was amplified with gene splicing by overlap extension PCR (SOE PCR) and constructed into pCDNA4.0 vector. Subsequently, the capability of the SopB^{Δ288-309} mutant to the activation and phosphorylation of Akt in HeLa cells was measured in comparison with the wide type SopB in order to assure the role of peptide spanning 288-309 peptide. [Result] In contrast with the null activation of empty vector, the overexpression of wide type SopB in HeLa cells obviously induces the activation and phosphorylation of pAkt₄₇₃. Absolutely different with wide type SopB, the overexpression of SopB^{Δ288-309} mutant abrogates the activation and phosphorylation of pAkt₄₇₃ in HeLa cells. [Conclusion] The peptide spanning 288-309 peptide is vital to the SopB-dependent pAkt₄₇₃ activation in HeLa cells. The deletion of the hydrophobic membrane spanning domain of SopB lead to that SopB could not subcellularly localize to cell membrane, which might be the reason to the loss of the SopB^{Δ288-309} mutant to the phosphorylation and activation of pAkt₄₇₃.

Key words *Salmonella*; SopB; AKT phosphorylation

沙门氏菌效应蛋白 SopB 是由沙门氏菌 SPI-1 III 型分泌系统分泌的一种由 561 个氨基酸构成的蛋白质分子, 是一种肌醇磷脂酶, 是目前沙门氏菌分泌的效应蛋白中研究最多、功能最多样化的一个蛋白^[1-5]。沙门氏菌效应蛋白 SopB 首先作用于质膜, 激活 SH3-鸟核苷酸交换因子(SGEF), 间接活化交换因子 RhoG, 从而进一步激活肌动蛋白, 诱导细胞骨架重排, 促使沙门氏菌侵入宿主细胞^[6]。沙门氏菌效应蛋白 SopB 能够激活原癌基因 Akt473 的磷酸化, 对细菌入侵介导的细胞凋亡具有抑制作用, 促进宿主细胞的存活, 为沙门氏菌在宿主细胞中的存活提供条件^[7]。同时, SopB 通过招募 RAB5 和 VPS34 到 SCV (*Salmonella*-Containing Vacuole, SCV), 促进 SCV 在宿主细胞内的形成和成熟, 这对沙门氏菌在宿主细胞内的存活与复制具有重要的意义^[8]。研究表明, 沙门氏菌效应蛋白 SopB 在感染宿主细胞后能够发生泛素化修饰, 该泛素化修饰在沙门氏菌感染宿主细胞的过程中发挥重要的作用^[9-10]。利用结构预测算法(TMpred prediction algorithm)软件分析发现沙门氏菌效应蛋白 SopB 第 288~309 位氨基酸之间的肽段拥有较强的跨膜螺旋结构域。该跨膜结构域被证实与效应蛋白 SopB 的泛素化修饰直接相关^[9]。

为了深入研究该 SopB 跨膜结合结构域在沙门氏菌感染过程中是否与受 SopB 诱导的 Akt 的磷酸化修饰和激活有关, 笔者利用重叠延伸 PCR 的方法构建 SopB 基因第 288~309 位肽段缺失的突变体, 即 SopB^{Δ288-309} 缺失突变体, 并与野生型 SopB 蛋白的功能进行比较, 以期确定该肽段与受 SopB 诱导的 Akt 的磷酸化修饰和激活之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株、宿主细胞和质粒载体。鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella Typhimurium* LT2)、大肠杆菌 (*E. coli*) Trans 10、pCDNA4.0 质粒载体、pCDNA4-SopB 重组质粒和 HeLa 细胞, 均由天津市食品生物技术重点实验室保存。

1.1.2 主要试剂。质粒 DNA 提取试剂盒和胶回收试剂盒, 购自英国 Omega 公司; Vent DNA polymerase、限制性内切酶 BamHI 和 EcoRI, 均购自美国 NEB 公司; T4 DNA 连接酶, 购自美国 Promega 公司; 细胞转染试剂 Vigofect, 购自威格拉斯生物技术(北京)有限公司; 引物, 由上海生工生物技术有限公司合成; 其他试剂均为国产分析纯, 市售。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pcDNA4-SopB^{Δ288-309} 突变体的构建。根据 NCBI 数据库公布的 *Salmonella Typhimurium* str. LT2 的 SopB 基因编码序列 (GenBank 号为 AE006468.1), 利用 Primer 5.0 软件设计 2 对引物 (表 1)。以 pCDNA4-SopB 重组质粒为模板, 分别利用 P1、P3 引物对以及 P2、P4 引物对扩增编码 SopB 0~288 蛋白的基因片段以及编码 SopB 309~561 蛋白的基

基金项目 国家自然科学基金(81101220); 天津市应用基础与前沿研究计划项目(12JCQNJC08100); “十二五”天津市中青年骨干创新人才支持计划。

作者简介 李晔(1990-), 女, 山东济南人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物与发酵。* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事病原微生物与基因工程研究。

收稿日期 2014-01-09

因片段。2 个片段进行 PCR 反应的扩增条件均为:94 °C,6 min;94 °C,30 s,58 °C,30 s,72 °C,1 min,30 个循环;72 °C,10 min。琼脂糖凝胶电泳检测并分别回收纯化 PCR 产物。最后利用 P1、P2 引物对,以等量的上述 2 种 PCR 产物为模板扩增 SopB^{Δ288-309} 缺失突变体编码基因。PCR 反应条件为:94 °C,6 min;94 °C,30 s,58 °C,30 s,72 °C,2 min,30 个循环;72 °C,10 min。琼脂糖凝胶电泳检测并回收纯化 PCR 产物。用限制性内切酶 BamHI 和 EcoRI 进行双酶切并纯化酶切后的片段,同时将质粒 pCDNA4.0 也经同样双酶切和纯化。最后,将 pCDNA4 与 SopB^{Δ288-309} 基因片段的酶切纯化产物用 T4 连接酶体系连接,转化 Trans 10 大肠杆菌感受态细胞,涂布于含 Amp^r 的 LB 平板上,37 °C 培养 12 ~ 16 h。挑取单个菌落接种于含 Amp^r 的 LB 液体培养基中,37 °C、200 r/min 振荡过夜,酶切鉴定,获得 pCDNA4-SopB^{Δ288-309} 重组质粒,测序确认插入序列正确。

表 1 构建沙门氏菌效应蛋白 SopB^{Δ288-309} 缺失突变体引物

引物名称	方向	序列 (5' - 3')	引物长度 bp
P1	SopB 上游引物	CG GGATCC ATGCAAATACAGAGCTTC-TATCAC (下划线为 BamHI 酶切位点)	32
P2	SopB 下游引物	CG GAATTC TCAAGATGTGATTAATGA-ATAAAT (下划线为 EcoRI 酶切位点)	28
P3	288 位反向引物	GGCTTTGTTAAGCAACTCAG (P4 引物下划线部分的反向互补序列)	20
P4	309 位正向引物	CTGAGTTGCTTAACAAAGCCATTTTCG-GCAAAGAGGG	37

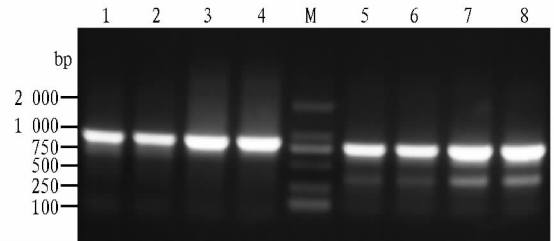
1.2.2 质粒转染 HeLa 细胞。参照的方法^[11-12]。

1.2.3 HeLa 细胞 pAKT473 激活情况的检测。参照文献的方法^[13],收集分别转染 pCDNA4 - SopB 野生型质粒和 pCDNA4 - SopB^{Δ288-309} 突变体质粒 24 h 后的 HeLa 细胞,将细胞加等体积 2 × SDS 载体缓冲液后,沸水浴煮沸 5 min,离心 1 min 后进行 10% SDS - PAGE 电泳,转膜,利用兔源抗 pAkt₄₇₃ 的一抗和羊抗兔二抗进行免疫印迹杂交,洗膜,最后通过 ECL 化学发光试剂盒进行 X 光片压片,洗片。同时利用 Akt 抗体作为对照。

2 结果与分析

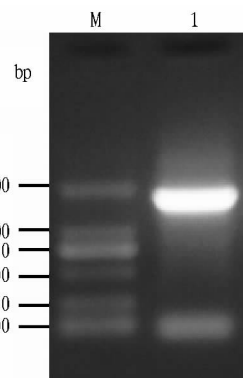
2.1 SopB^{Δ288-309} 突变基因的扩增 利用 pCDNA4-SopB 重组质粒作为模板,分别以 P1、P3 引物对和 P2、P4 引物对进行 PCR 扩增成功获得编码 SopB 0 ~ 288 蛋白序列的基因片段(图 1 泳道 1、2、3 和 4)以及 SopB 309 ~ 561 蛋白序列的基因片段(图 1 泳道 5、6、7 和 8)。从图中可以看出,2 种 PCR 片段的长度均在 DNA marker 的大小为 750 bp 的条带附近,而且编码 SopB 0 ~ 288 蛋白片段的 PCR 扩增产物的分子量(预期片段长度 864 bp)比编码 SopB 309 ~ 561 蛋白片段的 PCR 扩增产物的分子量(预期片段长度 756 bp)略大一些,与预期结果相吻合。继续以上述 2 种回收的 PCR 片段作模板,利用引物对 P1、P2 对其进行 PCR 扩增发现,成功扩增出了与预期的 SopB^{Δ288-309} 片段长度(1 620 bp)接近的 PCR 产物(图 2)。试验结果表明,通过重叠延伸 PCR 的方法即利用 2 种

PCR 片段作为模板,2 个片段之间各有 1 段 20 bp 左右的互补的序列,可以成功的获得去掉 288 ~ 309 位间氨基酸片段的 SopB^{Δ288-309} 基因片段。



注: M: DNA marker; 1、2、3 和 4: 编码 SopB 0 ~ 288 蛋白片段的 PCR 扩增产物; 5、6、7 和 8: 编码 SopB 309 ~ 561 蛋白片段的 PCR 扩增产物。

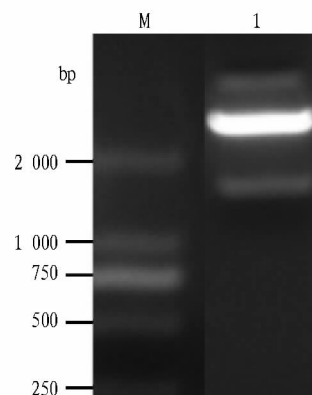
图 1 SopB 基因片段 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果



注: M: DNA marker; 1: SopB^{Δ288-309} 缺失突变体 PCR 扩增产物。

图 2 SopB^{Δ288-309} 缺失突变体 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 pCDNA4-SopB^{Δ288-309} 质粒的克隆 图 3 表明,经标准基因克隆程序将 SopB^{Δ288-309} 突变基因克隆至 pCDNA4 载体上,以限制性核酸内切酶 BamHI 和 EcoRI 对重组质粒进行双酶切后能够切下一条与预期条带大小一致的 DNA 片段(1 620 bp),表明 pCDNA4.0 载体上成功插入了目标 SopB^{Δ288-309} 基因片段,初步推断质粒构建成功。经 DNA 测序鉴定后挑取测序正确的阳性 pCDNA4-SopB^{Δ288-309} 重组质粒。



注: M: DNA marker; 1: pCDNA4-SopB^{Δ288-309}。

图 3 双酶切鉴定重组质粒 pCDNA4-SopB^{Δ288-309}

2.3 SopB^{Δ288-309} 缺失突变体异位表达对 HeLa 细胞 pAkt₄₇₃ 激活的影响 利用 Vigofect 作为转染试剂分别将空载体、

pCDNA4-SopB 以及 pCDNA4-SopB^{A288-309} 转染至 HeLa 细胞 24 h 后检测 HeLa 细胞中 Akt 第 473 位丝氨酸 (Akt₄₇₃) 被磷酸化修饰和激活的情况。图 4 表明,转染 pCDNA4 空载体的 HeLa 细胞中未检测到 pAkt₄₇₃ 的激活,而转染 pCDNA4-SopB 野生型 SopB 基因的 HeLa 细胞则 pAkt₄₇₃ 被明显激活。但与野生型不同,转染了 SopB 缺失突变体 SopB^{A288-309} 的质粒,其 pAkt₄₇₃ 未被检测到明显激活。试验结果表明,沙门氏菌效应蛋白 SopB 的第 288~309 位间的跨膜疏水片段对于受 SopB 诱导的 HeLa 细胞 pAkt₄₇₃ 的激活是必需的。

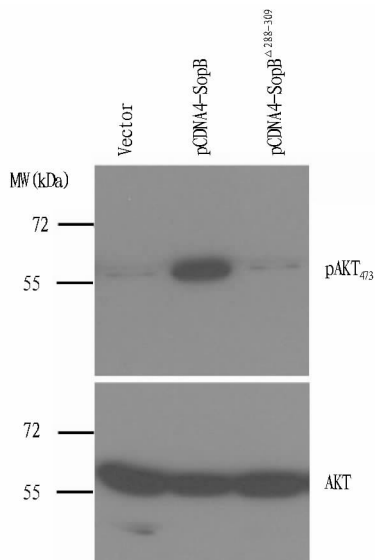


图 4 过表达 SopB 及其突变体 SopB^{A288-309} 对 HeLa 细胞 pAkt₄₇₃ 激活的影响

3 结论与讨论

试验利用重叠延伸 PCR 的方法构建了沙门氏菌效应蛋白 SopB 跨膜疏水片段 288~309 肽段缺失质粒,并利用该质粒与野生型 SopB 蛋白的功能进行比较,研究了该疏水肽段对 HeLa 细胞 pAkt₄₇₃ 激活的影响。结果发现,该疏水肽段对于 SopB 依赖的 HeLa 细胞 pAkt₄₇₃ 的激活是必需的。2009 年,Patel 等的研究发现,沙门氏菌效应蛋白 SopB^{A288-309} 缺失菌株感染宿主细胞后,SopB^{A288-309} 蛋白不能够发生与野生型 SopB 类似的泛素化修饰,表明 SopB 跨膜结构域 288~309 肽段与 SopB 蛋白的泛素化修饰直接相关,进一步研究该跨膜结构域与 SopB 亚细胞定位有关^[9]。当 SopB 缺失第 288~309 位肽段后,该 SopB 缺失突变体能够被分泌至宿主细胞中,而且该突变体的分泌量略低于野生型 SopB 蛋白。亚细胞定位研究表明,SopB^{A288-309} 突变体主要被转运至细胞的胞浆,与野生型 SopB 定位于细胞膜,胞浆以及 SCV 完全不同^[9]。基于此推测,288~309 跨膜螺旋结构域与 SopB 亚细胞定位至细胞

膜有关,当突变体不能定位至细胞膜以后,SopB 蛋白的泛素化也随之消失。试验利用穿梭质粒在 HeLa 细胞中表达 SopB^{A288-309} 突变体时发现该跨膜疏水片段与 HeLa 细胞 pAkt₄₇₃ 的激活直接相关。推测 SopB 对 pAkt₄₇₃ 磷酸化激活的功能依赖于其定位于宿主细胞膜,当 SopB 不能够亚细胞定位至细胞膜时会导致其激活功能的丧失。SopB^{A288-309} 的表型不像是由于该疏水跨膜结构域的缺失导致的蛋白整体构象的变化,因为纯化的 SopB^{A288-309} 突变体仍然具有与野生型 SopB 类似的肌醇磷脂酶活性^[9],但是该实验也不能排除另一种可能就是该段序列的去除可能影响到 SopB 局部构象的变化,例如改变了 SopB 与其他蛋白间的相互作用,而这些相互作用与 SopB 和膜的结合有关。综上所述,试验建立了一种利用重叠延伸 PCR 的方法构建蛋白的缺失突变体,为蛋白质功能的研究提供了一种可靠的手段。

参考文献

- [1] NORRIS F A, WILSON M, WALLIS T S, et al. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(24): 14057-14059.
- [2] HERNANDEZ L D, HUEFFER K, WENK M R, et al. *Salmonella* modulates vesicular traffic by altering phosphoinositide [J]. *Science*, 2004, 304(5678): 1805-1807.
- [3] AKOPYAN K, EDGREN T, WANG-EDGREN H, et al. Translocation of surface-localized effectors in type III secretion [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(4): 1639-1644.
- [4] ZHOU D, CHEN L M, HERNANDEZ L, et al. A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization [J]. *Mol Microbiol*, 2001, 39(2): 248-259.
- [5] AGBOR T A, MCCORMICK B A. *Salmonella* effectors: important players modulating host cell function during infection [J]. *Cell Microbiol*, 2011, 13(12): 1858-1869.
- [6] PATEL J, GALÁN J. Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions [J]. *Cell Biol*, 2006, 175(3): 453-463.
- [7] COOPER K G, WINFREE S, MALIK-KALE P, et al. Activation of Akt by the bacterial inositol phosphatase, SopB, is wortmannin insensitive [J]. *PLoS One*, 2011, 6: 22260.
- [8] MALLO G V, ESPINA M, SMITH A C, et al. SopB promotes phosphatidylinositol 3-phosphate formation on *Salmonella* vacuoles by recruiting Rab5 and Vps34 [J]. *J Cell Biol*, 2008, 182(4): 741-752.
- [9] PATEL J C, HUEFFER K, LAM T, et al. Diversification of a *Salmonella* virulence protein function by ubiquitin-dependent differential localization [J]. *Cell*, 2009, 137(2): 283-294.
- [10] KNODLER L A, WINFREE S, DRECKTRAH D, et al. Ubiquitination of the bacterial inositol phosphatase, SopB, regulates its biological activity at the plasma membrane [J]. *Cell Microbiol*, 2009, 11(11): 1652-1670.
- [11] 陶永清, 刘崇基, 李婕婷, 等. 沙门氏菌效应分子 SopB 激活 HeLa 细胞 MAPK 蛋白激酶的磷酸化 [J]. *中国医药生物技术*, 2011, 6(6): 432-436.
- [12] 阮海华, 赵霞, 张振奇. 过表达沙门氏菌效应蛋白 SopB 对 HeLa 细胞骨架的影响 [J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(6): 7067-7069.
- [13] YANG W L, WANG J, CHAN C H, et al. The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation [J]. *Science*, 2009, 325(5944): 1134-1138.