

## 幽门螺旋杆菌肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导蛋白活性分子的构建、结晶及初步晶体学研究\*

高明明<sup>1, 2)</sup> 张英<sup>1)</sup> 王大成<sup>1)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101; <sup>2)</sup>中国科学院大学, 北京 100039)

**摘要** 幽门螺旋杆菌中的肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白(Tip $\alpha$ )被鉴定为幽门螺旋杆菌致病感染中的新型致癌因子. Tip $\alpha$  通过 NF- $\kappa$ B 的激活诱导肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )的大量表达, 从而促使宿主的炎症反应以及肿瘤发生、发展的进程. Tip $\alpha$  的同源二聚体为其发挥生物学功能的活性形式, 此二聚体以两个单体间 N 端半胱氨酸形成的二硫键(Cys25-Cys25 与 Cys27-Cys27)共价连接. Tip $\alpha$  (25-192)的基因克隆至载体 pET22b 中, 并且在大肠杆菌菌株 BL21 (DE3)中以可溶形式高水平表达. 重组蛋白经过 Ni<sup>2+</sup> 金属亲和层析、阳离子交换层析和凝胶阻滞层析进行分离纯化. Tip $\alpha$  蛋白样品分别通过悬滴和 microbatch 的方法进行结晶搜索和优化. 母体和硒代晶体分别衍射到 2.2Å 和 2.6Å, 均属于 C2 空间群, 并且具有相似的晶胞参数. 母体晶体的晶胞参数为  $a=127.01\text{\AA}$ ,  $b=47.57\text{\AA}$ ,  $c=96.5\text{\AA}$ ,  $\alpha=\gamma=90^\circ$ ,  $\beta=127.5^\circ$ .

**关键词** 结晶, 纯化, 肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白, 致癌因子, 幽门螺旋杆菌

**学科分类号** Q5

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2012.00125

幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是慢性胃炎、消化性胃溃疡的主要致病因素, 与胃癌的发生密切相关, 被世界卫生组织列为一类致癌物<sup>[1-2]</sup>. *H. pylori* 致病多样性与尿素酶、过氧化氢酶、黏附因子、空泡毒素以及细胞毒素相关基因 A 蛋白息息相关<sup>[3-5]</sup>. 在 *H. pylori* 感染的过程中, 前炎症因子白介素 6、白介素 8 以及肿瘤坏死因子  $\alpha$  被诱导<sup>[2]</sup>, 它们激活细胞因子调控网络并且引发细胞应答<sup>[6]</sup>. 幽门螺旋杆菌的肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白(Tip $\alpha$ )是趋化因子基因表达的潜在诱导剂, 被认定为新型致癌因子<sup>[7-9]</sup>. Tip $\alpha$  通过 NF- $\kappa$ B 的激活来诱导肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )的大量表达, 从而发挥促瘤活性<sup>[10-11]</sup>. 肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$ , 是炎症反应的主要调节因子, 在从炎症到癌变的过程中起着细胞因子网络调节的关键作用<sup>[12]</sup>. 因此, Tip $\alpha$  是 *H. pylori* 致病的重要效应蛋白, 起着促进宿主炎症反应, 肿瘤发生、发展的作用.

Tip $\alpha$  在 *H. pylori* 中是特异存在的, 于其他物种中找不到明显的同源性. Tip $\alpha$  包括 192 个氨基酸, 由 *H. pylori* 以天然二聚体的形式分泌表达.

此二聚体由两个单体间 N 端半胱氨酸形成的一对二硫键(Cys25-Cys25 与 Cys27-Cys27)共价连接. 半胱氨酸 Cys25 与 Cys27 的同时缺失突变, 会使 Tip $\alpha$  由活性二聚体变为非活性的单体, 不能发挥其绑定于胃黏膜上皮细胞、诱导 TNF- $\alpha$ 、促瘤<sup>[9-11, 13]</sup>以及与 DNA 结合<sup>[14]</sup>等的生物学活性. 因此, Cys25 与 Cys27 的存在是 Tip $\alpha$  执行生物学功能的基础. 由于 N 端肽段的柔性, 带有二硫键的活性 Tip $\alpha$  分子进行结晶十分困难, 至今未见报道.

为了更好地研究 Tip $\alpha$  分子在活性状态下的三维结构及其与功能的关系, 我们成功构建了保留二硫键的活性 Tip $\alpha$  分子, 并且此同源二聚体蛋白样品用于结晶实验. 本文报道了 Tip $\alpha$  活性分子的构建, 结晶及初步晶体学分析.

\* 国家重点基础研究发展计划(973)(2011CB910304, 2011CB911103), 中国科学院知识创新工程(KSCXZ-EW-J-3)和卫生部重大新药创制专项(2009ZX09103-676)资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-64888547, E-mail: dcwang@ibp.ac.cn

收稿日期: 2012-03-13, 接受日期: 2012-05-15

## 1 材料与方法

### 1.1 基因克隆

重组的 Tip $\alpha$  活性分子去除了 N 端 24 个氨基酸, 从第 25 位半胱氨酸开始, 保留了二硫键形成的 2 个关键性氨基酸 Cys25 和 Cys27. Tip $\alpha$  (25-192) 的基因从 *H. pylori* 菌株 26695 的基因组中通过聚合酶链式反应(PCR)扩增出来, 正反向引物分别为 5' ggaattccatagtgcacttgcccaaac 3' 及 5' cgaactcgagcatggctataggac 3'. 扩增片段经过双酶切后插入到表达载体 pET22b(+) (Novagen) 的酶切位点 *Nde* I 和 *Xho* I 中. 一个包含有 6 个组氨酸的标签 (LEHHHHHH) 连在目标蛋白基因的 3' 端, 利于后续的金属螯合层析纯化. 然后通过 DNA 测序, 序列正确的重组质粒转化至表达菌株大肠杆菌 BL21 (DE3) 中.

### 1.2 表达与纯化

为了增大重组蛋白可溶表达的比例, 降低包涵体表达的比例, Tip $\alpha$  于低温、低浓度诱导剂 IPTG 的条件下在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中诱导表达. 细菌在含有 100 mg/L 抗生素 Amp 的培养基中于 37 $^{\circ}$ C 扩大培养至  $0.6 < A_{600} < 0.7$  之后, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L, 于低温 16 $^{\circ}$ C 诱导表达 20~24 h. 然后细菌经 4 000 r/min 离心收集, 冻存于 -20 $^{\circ}$ C.

菌体重悬于裂解液 (50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8.0, 300 mmol/L NaCl 和 10 mmol/L 咪唑), 通过超声破碎裂解细胞. 细胞裂解液在低温 4 $^{\circ}$ C 以 15 000 r/min 的高速离心去除掉细胞碎片. 收集上清液, 然后将上清液低速均匀地转运至 5 ml 已经由裂解缓冲液平衡好的 Ni-NTA 柱 (GE Healthcare) 上. 之后用洗脱缓冲液 (50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8.0, 300 mmol/L NaCl 和 20 mmol/L 咪唑) 清洗未与柱子结合的杂蛋白至紫外分光光度计检测 280 nm 的吸光度值不再变化. 最后洗脱液 (50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8.0, 300 mmol/L NaCl 和 250 mmol/L 咪唑) 洗脱目标蛋白. 经 Ni<sup>2+</sup> 金属亲和层析的初步纯化后, 采用阳离子交换层析的方法去除与目标蛋白结合的非特异性的核酸, 从而进一步纯化蛋白并保证蛋白质的均一性. 蛋白质经过低速离心 (4 000 r/min) 浓缩后, 采用迭代的方法, 用缓冲液 A (25 mmol/L Na/K pH 6.2) 稀释, 并浓缩蛋白改变蛋白质溶液的 pH 和盐浓度, 以利于后续的阳离子交换层析纯化. Hitrap SP 柱 (GE healthcare) 用缓冲液 A 平衡, 目标蛋白上

样后, 以 5 倍柱体积的缓冲液 A 清洗, 之后由缓冲液 A 和缓冲液 B (25 mmol/L Na/K pH 6.2, 2 mol/L NaCl) 混合形成的线性盐离子强度梯度洗脱目标蛋白. 最后通过凝胶阻滞层析来分离目的蛋白的二聚体和四聚体, 使蛋白质状态更均一, 并且更换溶解蛋白的缓冲液. 层析柱 HiLoad Superdex 75 Column (GE healthcare) 用流动相缓冲液 (25 mmol/L Bis-tris pH 6.8, 150 mmol/L NaCl) 平衡, 蛋白质上样后, 收集相应的出峰体积. 纯化过程中的每一步都通过 15% SDS-PAGE 来检测目标蛋白的纯度, 最终蛋白质纯度 > 95%, 可用于结晶实验.

Tip $\alpha$  硒代甲硫氨酸衍生物 (SeMet Tip $\alpha$ ) 蛋白的获得是通过在大肠杆菌甲硫氨酸合成代谢缺陷型菌株 B834 (DE3) 中表达实现的. 重组质粒转运至大肠杆菌 B834 (DE3) 中. B834 (DE3) 细胞在 LB 培养基中培养至  $0.6 < A_{600} < 0.7$  之后, 将细胞离心收集, 然后转移至 M9 培养基, 饥饿培养 2 h 之后, 加入硒代甲硫氨酸至其终浓度为 50 mg/L. SeMet Tip $\alpha$  蛋白的诱导及纯化条件与母体蛋白相同.

### 1.3 结晶

结晶实验全部在室温 20 $^{\circ}$ C 条件下进行. Tip $\alpha$  母体蛋白结晶搜索是通过悬滴气相扩散法, 在 16 孔板中, 将 1  $\mu$ l 的蛋白质溶液 (10 g/L) 与 1  $\mu$ l 的池液在盖玻片上混合后倒置于 500  $\mu$ l 池液上, 用真空脂密封. 用于初始结晶搜索的 Kit 有 Index、SaltRx、PEG/ION、PEG/ION 2、Crystal Screen 和 Crystal Screen 2 (Hampton Research). 结晶的优化是通过尝试不同的结晶方法, 在改变 pH、蛋白质浓度、离子强度、沉淀剂和不同分子质量的 PEG, 以及添加剂 (有机溶剂的类型和浓度) 等晶体生长的条件下进行的. 衍射用母体晶体样品是采用 microbatch 法, 将 1  $\mu$ l 的蛋白质溶液与 1  $\mu$ l 的池液置于 microbatch 板孔中混合, 用 20  $\mu$ l 石蜡油密封得到. SeMet Tip $\alpha$  蛋白晶体是在已经优化成熟的母体晶体生长条件的基础上, 对蛋白质浓度、有机溶剂的种类和浓度等参数做进一步细致的优化而得到.

### 1.4 数据收集与处理

用于结构解析的晶体衍射数据是在日本筑波 KEK 同步辐射站光子工厂 beam line 17A 站上收集. 数据收集温度 95K, 探测器为 ADSC Quantum 系列的 CCD. 较高分辨率的母体晶体数据在波长 0.96409 $\text{\AA}$  收集. 用于 MAD 求解的硒代的三套数据 Peak、Inflection 和 RemoteH 均来自于同一颗硒代

衍生物晶体, 其收集波长分别为  $0.97898\text{\AA}$ ,  $0.97917\text{\AA}$  和  $0.96395\text{\AA}$ . 用 CCP4 数据包中的程序 MOSFLM<sup>[15]</sup>完成数据的指标化、晶胞参数的修正以及强度的积分, SCALA<sup>[16]</sup>进行强度数据的归一化处理.

## 2 结果与讨论

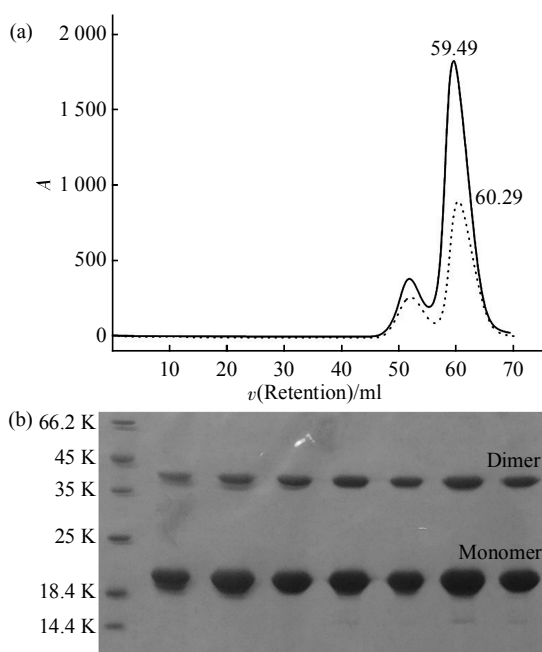
### 2.1 二硫键的鉴定与分析

我们所构建的包含有二硫键的 Tip $\alpha$  蛋白在层析行为上为二聚体. 在蛋白质纯化的最后一步凝胶阻滞层析中, 在酸性(pH 4)和中性(pH 7)的非还原性的条件下, HiLoad Superdex 75 Column 中 Tip $\alpha$  的主要出峰体积分别为 59.49 ml 和 60.29 ml, 对应的是理论二聚体 40 ku 的分子质量大小(图 1a). 因此, 我们构建的 Tip $\alpha$  蛋白由于二硫键的存在, 以不依赖于 pH 值的活性二聚体的形式稳定存在. 纯化后的 Tip $\alpha$  蛋白样品与聚丙烯酰胺凝胶电泳的 sample buffer(包含还原剂  $\beta$ -巯基乙醇和变性剂 SDS)以体积比 1:1 混合, 沸水浴加热 15 min 后进行电泳. 二聚体蛋白样品虽然经过还原剂的处理,

并且经过变性剂和加热等变性方法处理, 单体间的共价二硫键仍不能完全被破坏, 电泳结果显示为单体和二聚体两条条带(图 1b).

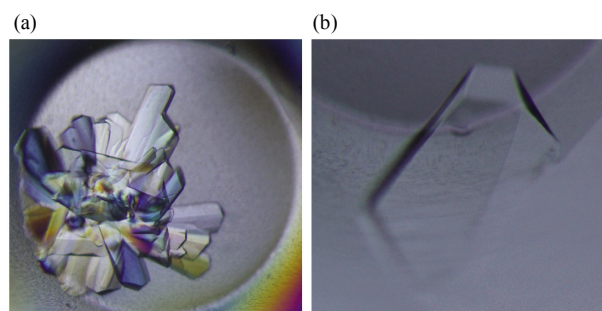
### 2.2 结晶与初步晶体学分析

在最初的晶体搜索中我们采用悬滴气相扩散法, 在 PEG/ION 2 N0.10(8% *v/v* Tacsimate pH 4.0, 20% *w/v* PEG3350)结晶条件下, 经过一个月后可观察到小菱形状薄片晶体. 尝试不同的结晶方法并且优化晶体生长的各种条件后, 我们采用 microbatch 法, 在 8% Tacsimate pH 3.5, 2% 1, 2-丙二醇(*v/v*), 5% MPD (*v/v*), 16% PEG3350 (*w/v*), 5%~10% 甘油 (*v/v*)的条件下, Tip $\alpha$  母体蛋白质浓度为 40 g/L, 经过一周的时间, 可获得衍射质量较好的母体晶体(图 2a). 同样采用 microbatch 法, 在母体晶体生长条件的基础上稍作调整, 确定了 SeMet Tip $\alpha$  蛋白的结晶条件, 为 8% Tacsimate pH 4.0, 2% 1, 2-丙二醇, 5% 二甲基亚砷和 16% PEG3350, SeMet Tip $\alpha$  蛋白浓度为 8 g/L(图 2b). 在数据收集之前, 晶体样品进行防冻和脱水预处理. 将晶体浸泡在 2 mol/L 甲酸锂中脱水 30~40 s, 然后用晶体环捞出, 将晶体迅速置于液氮气流中快速冷冻.



**Fig. 1 Gel filtration of Tip $\alpha$  at different pH conditions and SDS-PAGE of Tip $\alpha$**

(a) Gel filtration behaviors of active Tip $\alpha$  in HiLoad Superdex 75 column at pH 4 and pH 7, respectively. —: pH 4.0; ----: pH 7.0. (b) SDS-PAGE gel of Tip $\alpha$  dimer. The active dimer protein sample was mixed with the sample buffer including SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol and then heated for 15 min before electrophoresis.



**Fig. 2 Crystals of native Tip $\alpha$  and SeMet-derivatized Tip $\alpha$**

(a) Crystals of native Tip $\alpha$  protein grown by the microbatch method. (b) A crystal of SeMet-derivatized Tip $\alpha$  protein grown by the microbatch method.

Tip $\alpha$  的母体晶体以及硒代衍生物晶体数据收集的统计结果列于表 1. 母体晶体衍射到  $2.2\text{\AA}$ , 属于 C2 空间群, 晶胞参数为  $a=127.01\text{\AA}$ ,  $b=47.57\text{\AA}$ ,  $c=96.5\text{\AA}$ ,  $\alpha=\gamma=90^\circ$ ,  $\beta=127.5^\circ$ . 晶体的不对称单位中包含一个二聚体分子, 晶胞溶剂含量达 54.7%. 硒代衍生物晶体衍射到  $2.6\text{\AA}$ , 与母体晶体相比, 属于同样的空间群, 并且具有相似的晶胞参数.

Tip $\alpha$  的母体蛋白晶体和 SeMet Tip $\alpha$  蛋白晶体衍射数据的采集和处理结果较为满意, 目前用

MAD 法求解相位和高分辨率结构解析工作正在进

**Table 1** Data-collection statistics for the native and SeMet-derivatized Tip $\alpha$  crystals

	Native	MAD		
		Peak	Inflection	RemoteH
Resolution/Å	33.89~2.2	49.15~2.6	49.15~2.65	49.15~2.7
Wavelength/Å	0.96409	0.97898	0.97917	0.96395
Space group	C2		C2	
Unit cell parameters				
a, b, c (Å)	127.01, 47.47, 96.5	138.7, 46.93, 99.1	138.71, 46.91, 99.06	139.21, 47.08, 99.07
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90, 127.5, 90	90, 127.78, 90	90, 127.76, 90	90, 127.68, 90
No. of unique reflections	22761	15779	14908	14244
Completeness/%	97 (82.8)	99.9 (99.9)	99.8 (100)	99.8 (100)
Redundancy	4.6 (3.3)	7.2 (7.3)	7.1 (7.4)	3.6 (3.6)
Average $I/\delta(I)$	13.1 (3.9)	17.7 (4.7)	17.8 (4.0)	11.2 (2.8)
$R_{\text{merge}}$ /%	6.9 (38.8)	10.2 (37.4)	10.9 (40.8)	11.7 (40.7)

$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$ , where  $\langle I(hkl) \rangle$  is the mean of the observations  $I_i(hkl)$  of reflection  $hkl$ . Values in parentheses are for the highest resolution shell.

**致谢** 感谢第三军医大学邹全明教授提供幽门螺旋杆菌基因组。感谢日本 KEK 光子工厂 beamline 17A 站的工作人员以及上海同步辐射光源 17U1 站的工作人员在数据收集工作中给予的帮助和支持。

### 参 考 文 献

- [1] Hunt R H. The role of *Helicobacter pylori* in pathogenesis: the spectrum of clinical outcomes. Scand J Gastroenterol, 1996, **220**(Suppl): 3-9
- [2] Peek R M, Jr, Blaser M J. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. Nat Rev Cancer, 2002, **2**(1): 28-37
- [3] Radosz-Komoniewska H, Bek T, Jozwiak J, et al. Pathogenicity of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Infect, 2005, **11**(8): 602-610
- [4] Rieder G, Fischer W, Haas R. Interaction of *Helicobacter pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules. Curr Opin Microbiol, 2005, **8**(1): 67-73
- [5] Wroblewski L E, Peek R M, Wilson K T. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. Clin Microbiol Rev, 2010, **23**(4): 713-739
- [6] Censini S, Stein M, Covacci A. Cellular responses induced after contact with *Helicobacter pylori*. Curr Opin Microbiol, 2001, **4**(1): 41-46
- [7] Suganuma M, Kurusu M, Okabe S, et al. *Helicobacter pylori* membrane protein I: a new carcinogenic factor of *Helicobacter pylori*. Cancer Res, 2001, **61**(17): 6356-6359
- [8] Voland P, Weeks D L, Vaira D, et al. Specific identification of three low molecular weight membrane-associated antigens of *Helicobacter pylori*. Aliment Pharmacol Ther, 2002, **16**(3): 533-544
- [9] Suganuma M, Kuzuhara T, Yamaguchi K, et al. Carcinogenic role of tumor necrosis factor-alpha inducing protein of *Helicobacter pylori* in human stomach. J Biochem Mol Biol, 2006, **39**(1): 1-8
- [10] Kuzuhara T, Suganuma M, Kurusu M, et al. *Helicobacter pylori*-secreting protein Tipalpha is a potent inducer of chemokine gene expressions in stomach cancer cells. J Cancer Res Clin Oncol, 2007, **133**(5): 287-296
- [11] Suganuma M, Yamaguchi K, Ono Y, et al. TNF-alpha-inducing protein, a carcinogenic factor secreted from *H. pylori*, enters gastric cancer cells. Int J Cancer, 2008, **123**(1): 117-122
- [12] Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. Nat Rev Cancer, 2009, **9**(5): 361-371
- [13] Suganuma M, Kurusu M, Suzuki K, et al. New tumor necrosis factor-alpha-inducing protein released from *Helicobacter pylori* for gastric cancer progression. J Cancer Res Clin Oncol, 2005, **131**(5): 305-313
- [14] Kuzuhara T, Suganuma M, Oka K, et al. DNA-binding activity of TNF-alpha inducing protein from *Helicobacter pylori*. Biochem Biophys Res Commun, 2007, **362**(4): 805-810
- [15] Rossmann M G, van Beek C G. Data processing. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1999, **55**(10): 1631-1640
- [16] Collaborative Computational Project N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1994, **50**(5): 760-763

## Crystallization and Preliminary Crystallographic Studies of Active TNF- $\alpha$ -Inducing Protein From *Helicobacter Pylori*\*

GAO Ming-Ming<sup>1,2)</sup>, ZHANG Ying<sup>1)</sup>, WANG Da-Cheng<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

<sup>2)</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract** Tip $\alpha$  (TNF- $\alpha$ -inducing protein) from *Helicobacter pylori* is identified as a new carcinogenic factor. Tip $\alpha$  induces high expression of TNF- $\alpha$  through NF- $\kappa$ B activation, thus promoting host inflammation and tumor progression. The homodimer of Tip $\alpha$  as its active form for functional performances is cross-linked by a pair of inter-molecular disulfide bridges (Cys25-Cys25 and Cys27 and Cys27). Tip $\alpha$  (25~192) was cloned into pET22b and expressed as soluble protein in *E. coli* strain BL21 (DE3). Recombinant active Tip $\alpha$  was first purified through Ni<sup>2+</sup>-chelating chromatography, and then further purified by cation-exchange chromatography and size-exclusion chromatography to get the pure homodimer protein. Native Tip $\alpha$  and SeMet Tip $\alpha$  were crystallized and optimized using hanging drop and microbatch methods, with diffraction to 2.2Å and 2.6Å, respectively. These crystals belonged to C2 space group with similar unit-cell parameters. The native protein crystal had unit-cell parameters  $a=127.01\text{Å}$ ,  $b=47.57\text{Å}$ ,  $c=96.5\text{Å}$ ,  $\alpha=\gamma=90^\circ$ ,  $\beta=127.5^\circ$ . An attempt to solve the three-dimensional structure of this protein by MAD method is under way.

**Key words** crystallization, purification, Tip $\alpha$ , carcinogenic factor, *Helicobacter pylori*

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2012.00125

---

\*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2011CB910304, 2011CB91103), The Chinese Academy of Sciences (KSCXZ-EW-J-3) and The Ministry of Health, China (2009ZX09103-676).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-10-64888547, E-mail: dcwang@ibp.ac.cn

Received: March 13, 2012 Accepted: May 15, 2012