

肺炎克雷伯菌抗CRISPR蛋白AcrIE10的表达纯化及晶体结构解析

杨 杨¹ 徐蔚腾² 王楚宁¹ 李 丹¹ 徐晓刚¹ 麻锦彪² 王明贵^{1△}

(¹复旦大学附属华山医院抗生素研究所 上海 200040; ²复旦大学生命科学学院生物化学与生物物理学系 上海 200438)

【摘要】 目的 构建抗CRISPR蛋白AcrIE10的原核表达纯化体系,并通过X射线衍射技术解析其晶体结构。**方法** 以肺炎克雷伯菌基因组DNA为模板,将 $acrIE10$ 基因克隆至pET28a-SUMO表达载体,构建重组质粒pET28a-SUMO-AcrIE10,将其转化进感受态细胞BL21(DE3)。通过优化蛋白纯化过程中的条件,确定AcrIE10的最佳纯化条件。通过Ni-NTA亲和层析以及凝胶过滤层析,获得高纯度、高浓度的蛋白溶液。通过晶体培养和筛选,在上海同步辐射光源光束线站收集蛋白晶体衍射数据。**结果** 成功构建抗CRISPR蛋白AcrIE10的原核表达纯化体系,切除6×His和SUMO标签蛋白后,确定其最佳纯化温度为20℃;经Ni-NTA亲和层析以及凝胶过滤层析方法纯化后得到的蛋白溶液浓度为18 g/L。在PEG 3000($w/v=10\%$) + 咪唑(0.1 mol/L) + 盐酸(pH=8.0) + 硫酸锂(0.2 mol/L)的结晶条件下,获得高质量蛋白晶体,解析出AcrIE10单体的晶体结构,衍射分辨率为2.39 Å。AcrIE10以同源二聚体形式存在,整体结构由1个较短的 β -折叠($\beta 1$)和6段 α -螺旋($\alpha 1\sim\alpha 6$)构成,N端区域由 $\beta 1$ 、 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 构成典型的带状-螺旋-螺旋(ribbon-helix-helix,RHH)结构域。**结论** 肺炎克雷伯菌的AcrIE10蛋白可在原核生物中高效表达。在切除6×His和SUMO标签蛋白后,20℃下纯化可获得高纯度AcrIE10蛋白。AcrIE10蛋白的N端具有典型的RHH结构域,提示其可能为双功能抗CRISPR蛋白。

【关键词】 蛋白纯化; Ni-NTA亲和层析; 凝胶过滤层析; 蛋白结构解析; AcrIE10; 肺炎克雷伯菌

【中图分类号】 Q816 **【文献标志码】** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-8467.2026.05.012

Expression, purification and crystal structure analysis of the anti-CRISPR protein AcrIE10 from *Klebsiella pneumoniae*

YANG Yang¹, XU Wei-teng², WANG Chu-ning¹, LI Dan¹, XU Xiao-gang¹,
MA Jin-biao², WANG Ming-gui^{1△}

(¹Institute of Antibiotics, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; ²Department of Biochemistry and Biophysics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China)

【Abstract】 Objective To construct a prokaryotic expression vector of the anti-CRISPR protein AcrIE10, and to determine the crystal structure of AcrIE10 protein by X-ray diffraction technology. **Methods** With the genomic DNA of *Klebsiella pneumoniae* as the template, the $acrIE10$ gene was inserted into the pET28a-SUMO expression vector to construct the recombinant plasmid pET28a-SUMO-AcrIE10, which was then transformed into the competent cell BL21 (DE3). We adjusted the environmental temperature during the protein purification process to explore the optimal purification conditions for the anti-CRISPR protein (AcrIE10). Using Ni-NTA affinity chromatography and gel

上海市卫健委青年项目(22410710300)

[△]Corresponding author E-mail: mgwang@fudan.edu.cn

网络首发时间:2026-09-07 13:32:25 网络首发地址:https://link.cnki.net/urlid/31.1885.R.20260905.1044.002

filtration chromatography, a pure and high-concentration protein solution was obtained. Then we cultivated and screened crystals, and collected protein crystal diffraction data at Shanghai Synchrotron Radiation Facility beamline station. **Results** The recombinant plasmid pET28a-SUMO-AcrIE10 was constructed and transformed into competent BL21 (DE3) cells. After removing the 6×His and SUMO tag proteins, the optimal purification temperature was 20 °C. After purification by Ni-NTA affinity chromatography and gel filtration chromatography, the protein solution concentration was 18 g/L. Appropriate crystals were grown under the conditions of PEG 3000 ($w/v=10\%$), imidazole (0.1 mol/L), hydrochloric acid (pH=8.0) and lithium sulfate (0.2 mol/L). The crystal diffraction resolution was 2.39 Å. The crystal structure of AcrIE10 apo was successfully resolved. The structure analysis showed that the AcrIE10 protein assembled in a homodimeric form. Its overall folding consisted of a short β -sheet ($\beta 1$) and six α -helices ($\alpha 1$ - $\alpha 6$). $\beta 1$ and $\alpha 1$, $\alpha 2$ formed the N-terminal domain of the AcrIE10 protein, which was a typical ribbon-helix-helix (RHH) domain. **Conclusion** The AcrIE10 protein of *Klebsiella pneumoniae* can be highly expressed in the prokaryotic expression system. By removing the 6×His and SUMO tags and using a purification temperature of 20 °C, the AcrIE10 protein can be obtained more efficiently. The AcrIE10 protein has a typical RHH domain, suggesting that it might be a bifunctional protein.

【Key words】 protein purification; Ni-NTA affinity chromatography; gel filtration chromatography; protein structure analysis; AcrIE10; *Klebsiella pneumoniae*

* This work was supported by the Youth Project of Shanghai Municipal Health Commission (22410710300).

成簇规律间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 相关 (CRISPR-associated, CRISPR-Cas) 系统是已知的唯一一种原核生物的适应性免疫系统^[1]。这一系统在细菌和古生菌中广泛存在,并能抵御诸如噬菌体和质粒等可移动遗传元件的入侵^[2]。CRISPR-Cas 系统主要分为两类^[3],其中第 I 类系统负责 CRISPR-Cas 防御系统干扰阶段的靶标识别与降解,由一条 61 个核苷酸组成的 crRNA 骨架和 5 种 Cas 蛋白亚基按照严格的化学计量比组装而成的 cascade 复合物以及核酸酶 Cas3 共同组成。

抗 CRISPR (anti-CRISPR, Acr) 蛋白于 2013 年首次在铜绿假单胞菌 Mu 样噬菌体中被发现^[4],是一类可直接且特异性抑制 CRISPR-Cas 系统的小分子蛋白。2013—2020 年至少 54 个 Acr 蛋白家族被陆续鉴定出来,包括 100 多种 Acr 成员^[5]。其中多数由生物信息学方法预测,仅少数通过蛋白结构和功能研究得以验证^[5-7]。Acr 蛋白在噬菌体体内表达量较低,但是功能强大,微量即可发挥抑制 CRISPR 系统的防御功能^[8]。然而,许多 Acr 蛋白在体外理化性质不稳定,无法得到纯度和浓度符合要求的蛋白水溶液,因此限制了研究的深入开展^[9]。

最初 Acr 蛋白多在噬菌体中发现^[10],近年来细菌中的 Acr 蛋白相继被报道,包括 AcrIE10 蛋白。该蛋白是一种针对 I-E 型 CRISPR-Cas 系统发挥抑制功能的小分子蛋白,广泛分布于噬菌体和细菌的基因组中,在细菌中主要分布于肺炎克雷伯菌的质粒上。研究表明,AcrIE10 可与 I-E 型 CRISPR-Cas 系统中的 Cas7 亚基互作,抑制 CRISPR-Cas 系统的功能,从而协助碳青霉烯类耐药质粒 bla_{KPC} 逃逸 CRISPR-Cas 系统的靶向攻击,维持 bla_{KPC} 质粒在细菌体内的稳定存在,最终导致耐药质粒在肺炎克雷伯菌中的传播^[11-13]。所以,在临床菌株中开展耐药质粒编码的 Acr 蛋白的功能和机制的研究具有重要意义。R41 (GenBank 序列号: SAMN29388315) 是一株临床分离的碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌,本课题组通过对 R41 全基因组测序发现其携带一个含包括 bla_{KPC} 在内多种耐药基因的质粒,可介导多种抗菌药物耐药。在该 bla_{KPC} 质粒的“抗免疫系统基因簇”中发现了 *acrIE10* 基因,推测其可能与 bla_{KPC} 耐药质粒的传播密切相关。

本研究旨在建立抗 CRISPR 蛋白体外的高效表达与纯化体系,并通过晶体培养及 X 射线衍射收集 AcrIE10 蛋白晶体的衍射数据,解析其晶体结构。

材 料 和 方 法

菌株和质粒 感受态 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)购买自生工生物工程(上海)股份有限公司。工程质粒 pET28a-SUMO 由复旦大学附属华山医院抗生素研究所分子实验室保存。

试剂和仪器 PCR 预混液、2 $\times$ Phanta Flash Master Mix、DNA 纯化试剂盒和 CBB 染液(南京诺唯赞生物科技股份有限公司);限制性内切酶(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);同源重组酶(艾科瑞生物工程有限公司);晶体筛选试剂盒(日本 Rigaku 公司、美国 Hampton Research 公司)。

ÄKTA Avant 液相色谱系统(美国 Cytiva 公司);LL PLUS 蠕动泵[卡川尔流体科技(上海)有限公司];Nanodrop 2000 分光光度计、Sorvall LYNX 6000 超速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

质粒表达载体的构建 以肺炎克雷伯菌 R41 (GenBank 序列号: SAMN29388315) 基因组 DNA 为模板克隆 *acrIE10* 基因,通过酶切连接方法插入原核表达质粒 pET28a-SUMO,获得 AcrIE10 蛋白表达载体。上游引物:5'-TGGTGGATCCGAATTCGTGAAAAAAGAGATCTCCCGCAACC-3',下游引物:5'-GTGCGGCCGCAAGCTTTCAGCGATCGAGCCGTTC-3'。使用 2 $\times$ Phanta Flash Master Mix 进行 PCR 反应获得目的片段,反应条件:98 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,56 $^{\circ}$ C 退火 5 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 6 s,变性、退火、延伸循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 终延伸 1 min。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分离,通过胶回收试剂盒回收目的 DNA。*EcoR* I 和 *Hind* III 酶切线性化后的 pET28a-SUMO 载体与 *acrIE10* 基因以摩尔比 1:3 混合,用同源重组酶在 50 $^{\circ}$ C 下连接 10 min,连接产物转化进 DH5 α 感受态细胞,筛选重组子并测序验证。

蛋白表达纯化 从 -80 $^{\circ}$ C 的冰箱中复苏 pET28a-SUMO-AcrIE10 甘油菌,挑取 pET28a-SUMO-AcrIE10 单克隆,接种于 20 mL 含终浓度 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 肉汤中,过夜培养;次日稀释至 1 L 含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 肉汤,37 $^{\circ}$ C 下 180 r/min 增菌;监测菌液的吸光度(*D*)至 0.6,将菌液置于 18 $^{\circ}$ C 下降温;待菌液降温到 18 $^{\circ}$ C,加入

IPTG 诱导蛋白表达,IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L;18 $^{\circ}$ C 下 180 r/min 诱导蛋白表达;18~20 h 后收集菌液,2 380 $\times g$ 离心 15 min,收集菌沉。向菌沉中加入 3~4 倍体积的裂解缓冲液,同时加入终浓度为 1 mmol/L 的 PMSF 以防止目的蛋白降解;使用 JN-3000 mini 高压细胞破碎仪将菌体破碎 3~4 次,压力为 1.2×10^6 kPa。将破碎后的菌液分装在超速离心管中,配平后,24 370 $\times g$ 离心 1 h,取上清,弃沉淀。使用 Ni-NTA 亲和树脂富集目的蛋白:将上清接入蠕动泵,使携带 6 $\times$ His 标签的目的蛋白流过镍柱。在蛋白洗脱的过程中使用 ÄKTA 自动化蛋白纯化层析系统:用缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl+500 mmol/L NaCl+25 mmol/L 咪唑)平衡管道后将镍柱接入系统,进行目的蛋白洗脱。洗脱完成,收集 A280 出峰位置下的 EP 管,进行 SDS-PAGE 电泳鉴定,获取相应的目的蛋白。使用 6 $\times$ HisTag-SUMO 蛋白促溶目的蛋白的标签,利用 Ulp1 蛋白酶可以特异性切除整个标签。根据 SDS-PAGE 胶图,选择合适出峰位置的蛋白加入透析袋中,并加入适量 Ulp1 蛋白酶进行酶切。将透析袋置于透析液(25 mmol/L Tris-HCl+150 mmol/L NaCl)中,4 $^{\circ}$ C 下磁力搅拌器连续搅拌透析 5 h。收集蛋白溶液,接上蠕动泵,进行第二次镍柱亲和层析;收集流穿液及洗脱液,并通过 SDS-PAGE 电泳鉴定,收集目的蛋白。浓缩后行凝胶过滤层析,根据目的蛋白的相对分子质量(以下简称“分子量”,约为 13 000),选择型号为 HiLoad 16/600 Superdex 75 μ g 的分子筛接入 ÄKTA 系统,设置流速为 1 mL/min,缓冲液体系为 25 mmol/L Tris-HCl+150 mmol/L NaCl。

收集凝胶过滤层析纯化后的 AcrIE10 蛋白,将蛋白溶液平均分成 3 份,分别置于 4 $^{\circ}$ C、12 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C 下离心浓缩。根据 AcrIE10 蛋白的分子量(约为 13 000),选择孔径为 3 000 的蛋白浓缩管,4 $^{\circ}$ C 下 2 380 $\times g$ 离心浓缩。每 10~15 min 停止,将浓缩管上下颠倒混匀,移液枪轻柔吹打过滤膜,防止局部浓度过高引起蛋白沉淀。离心 30 min 后,取出不同温度下离心的浓缩管,用 EP 管(1.5 mL/管)收集蛋白水溶液。

对于切除标签的目的蛋白,取样进行 SDS-PAGE 电泳以验证蛋白纯度,同时使用 NanoDrop 2000 测定蛋白溶液的浓度。测完浓度后,13 709 $\times g$ 离心 10 min,取上清蛋白溶液进行分装,每管 100 μ L,

液氮速冻, -80 °C 冰箱保存。

蛋白晶体筛选 使用自动化结晶系统 Gryphon (美国 Art Robbins Instruments 公司) 对蛋白进行大规模晶体点样筛选。点样程序由系统自动设定, 在 96 孔晶体点样板每孔中添加 50 μ L 池液, 在 drop 处会添加 0.2 μ L 样品以及 0.2 μ L 池液。点板完成后对点样板进行封膜, 置于恒温 18 °C 晶体房中待晶体生长。筛选所使用的晶体池液试剂盒包括 Crystal Screen 1/2、Natrix、Index、PEG/ION、SaltRx1/2 (美国 Hampton Research 公司) 以及 Wizard 1/2、Wizard 3/4 (日本理学株式会社)。

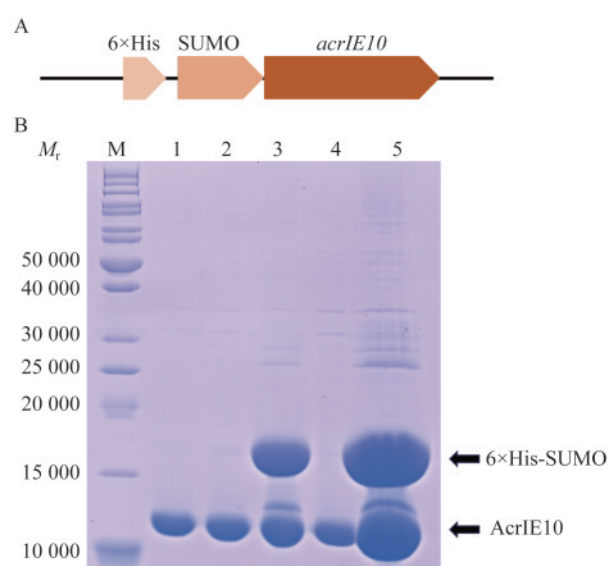
蛋白晶体结构解析 待晶体生成, 挑选体积较大、质地坚硬的单晶, 用 loop 捞取后迅速用液氮冻存。送至上海同步辐射光源收集 X 射线衍射数据, 收集方式采用中心旋转衍射, 即让晶体绕转角器中心轴旋转 360°, 每 1° 收集 1 张衍射画面。首先采用 HKL3000 程序包初步处理衍射数据, 再使用分子置换法进行相位解析, 以 AlphaFold3 (<http://alphafoldserver.com>) 预测模型作为初始模型, 将其拟合至电子密度图中。利用 CCP4、XDS 及 Phenix 等软件套装, 对数据进行进一步处理与分析, 并将正确的氨基酸序列构建到电子密度中。通过 Phenix 软件的自动精修功能与 Coot 程序的手动调整相结合, 对蛋白三维结构进行迭代优化, 直至各项评估指标 (包括 Rmerge、数据完整性、Rwork 和 Rfree) 均达到结构解析的标准要求。

结 果

pET28a-SUMO-AcrIE10 重组表达载体的验证 以 R41 细菌的基因组为模板, PCR 扩增 *acrIE10* 基因, 基因长度为 318 bp, 琼脂糖凝胶电泳验证目的基因长度正确。目的片段与线性化载体 pET28a-SUMO 重组连接后转化至大肠埃希菌 *DH5 α* 感受态细胞中, 测序确认无误后, 将重组质粒转化进 BL21 (DE3) 中, 挑选阳性转化菌株用于后续试验。

蛋白的表达纯化 使用 6 $\times$ His 标签富集目的蛋白, 使用 SUMO 标签增加可溶性蛋白的表达 (图 1A)。用上述阳性表达菌株进行扩大培养, 通过超声破碎、离心取上清液、Ni-NTA 亲和层析及凝胶过滤层析得到目的蛋白。经专业网站 (https://www.detaibio.com/sms2/protein_mw.html) 计算预测, 各蛋

白的理论分子量如下: 6 $\times$ His-SUMO-AcrIE10 为 27 000, 6 $\times$ His-SUMO 为 14 000, AcrIE10 为 13 000。结果表明, Ulp1 酶将目的蛋白和 6 $\times$ His-SUMO 促溶标签成功切开 (图 1B, 泳道 5)。将酶切后产物再次使用 Ni-NTA 挂柱, 6 $\times$ His-SUMO 融合标签蛋白应该挂在 Ni 柱上, 而目的蛋白则进入流穿液。流穿液中有较多目的蛋白和少量杂蛋白 (图 1B, 泳道 4), 继续进行凝胶过滤层析以滤除杂蛋白。取峰下蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 经过凝胶过滤层析后, 溶液中几乎无杂蛋白 (图 1B, 泳道 1~2)。经 Ni-NTA 亲和树脂的过滤及凝胶过滤层析, 成功得到纯净的 AcrIE10 蛋白。综上所述, pET28a-SUMO 蛋白表达载体可用作 AcrIE10 蛋白的表达纯化。



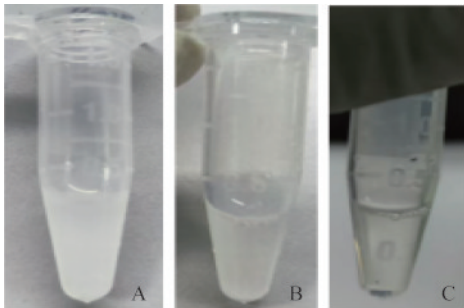
A: Cartoon representation of *acrIE10* expression vector; B: Analysis of SDS-PAGE of the intermediate product of AcrIE10 expression and purification. M: Marker; 1-2: Protein eluted from the gel filtration chromatography peak; 3: Elution solution of Ni-NTA by high imidazole; 4: Flow solution of Ni-NTA; 5: Products after enzymatic digestion by Ulp1.

图 1 AcrIE10 蛋白的表达情况

Fig 1 Expression of AcrIE10 protein

蛋白的浓缩温度 一般来说, 蛋白溶液浓度越高, 越容易培养出蛋白晶体。为了得到高浓度蛋白溶液, 使用蛋白浓缩管对蛋白溶液进行浓缩。取相同体积澄清的蛋白水溶液, 在不同温度、相同转速下离心 30 min。结果发现, 在 4 °C 时蛋白发生沉降, 随着温度升高, 溶液逐渐变澄清, 在 20 °C 时溶液呈现澄清透明 (图 2), 取上清液检测蛋白浓度。NanoDrop 2000 读数显示: 4 °C 时为 1.1 g/L, 12 °C 时为 7.9 g/L, 20 °C

时为 18.0 g/L。随着温度逐渐升高,AcrIE10 蛋白的溶解度逐渐升高,接近室温时得到高浓度 AcrIE10 蛋白水溶液。由此可见,AcrIE10 蛋白是一个喜温蛋白,建议浓缩时离心机温度设置为 20 ℃。



The centrifuge was set to a temperature of 4 ℃ (A), 12 ℃ (B) and 20 ℃ (C) with a rotation speed of 2 380×g. After centrifugation for 30 minutes, the protein solution was collected.

图2 不同温度下离心 30 min 后收集的蛋白溶液
Fig 2 Protein solutions collected after centrifugation for 30 minutes at different temperatures

蛋白晶体培养与衍射数据收集 通过提高浓缩温度得到 18 g/L 的 AcrIE10 蛋白溶液,使用该浓度的蛋白溶液进行蛋白质晶体的筛选。96 孔晶体板在恒温 18 ℃ 的晶体房中放置 48 h,可见不同条件下的晶体生长。AcrIE10 蛋白在 PEG 3000($w/v=10\%$)+咪唑(0.1 mol/L)+盐酸(pH=8.0)+硫酸锂(0.2 mol/L)的条件下生长出合适的晶体,单晶呈长条块状,形状规则(图 3)。将单晶送至上海同步辐射光源进行 X 射线衍射,共收集 360 张衍射画面。



图3 AcrIE10 蛋白晶体
Fig 3 Protein crystal of AcrIE10

蛋白晶体结构解析 AcrIE10 晶体衍射数据首先采用 HKL3000 程序包进行初步处理,再使用分子置换法进行相位解析,以 Alphafold3 (<http://alphafoldserver.com>) 预测模型作为初始模型,将其拟合至电子密度图中。利用 CCP4、XDS 及 Phenix

等软件套装,对数据进一步处理和分析,并将正确的氨基酸序列构建到电子密度中。通过 Phenix 软件的自动精修功能与 Coot 程序的手动调整相结合,对蛋白三维结构进行迭代优化,直至各项评估指标(包括 Rmerge、数据完整性、Rwork 和 Rfree)均达到结构解析的标准要求(表 1)。经蛋白数据库(Protein Data Bank,PDB)审核确认该晶体结构无误,并获得唯一标识号 9M71 和结构验证报告。

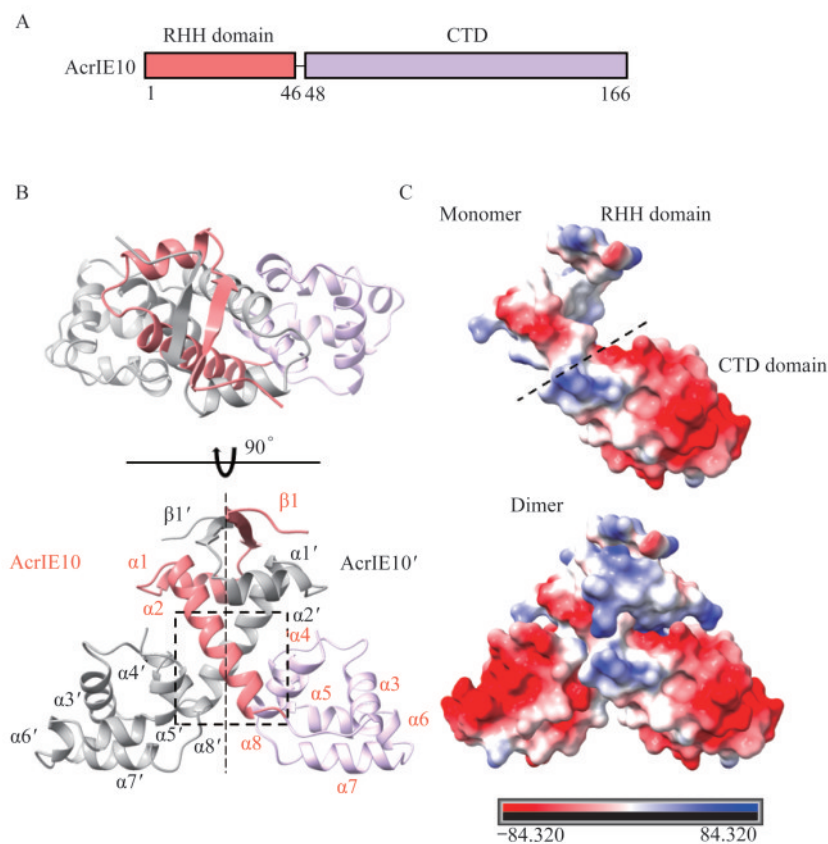
表 1 AcrIE10 单体的晶体结构参数
Tab 1 The crystal structure parameters of the AcrIE10 monomer

Crystallographic statistics	AcrIE10-Apo
Data collection	
Space group	P 61 2 2
Cell dimensions	
a, b, c (Å)	68.91, 68.91, 233.22
α, β, γ (°)	90, 90, 120
Resolution (Å)	2.39–43.46
R_{merge} (%)	0.084 (1.355)
I/σ (1)	32.4 (4.0)
Completeness (%)	100.0 (99.9)
Redundancy	20.1 (20.4)
CC1/2 in highest shell	0.952
Refinement	
No. of reflections	13 813
R_{work} (%) / R_{free} (%)	0.204 5 / 0.249 2
No. of atoms	1 806
Protein	1 794
DNA	0
Water	12
B-factors (Å ²)	64.1
R.m.s. deviations	
Bond length (Å)	0.007
Bond angle (°)	1.257
Ramachandran plot (%)	
Favored	95.02
Allowed	4.98
Disallowed	0

蛋白晶体结构特征分析 AcrIE10 蛋白单体(图 4A)采用同源二聚体形式组装(图 4B),其整体折叠由 1 个较短的 β -折叠片($\beta 1$,残基 2~12)和 6 段 α -螺旋构成,依次为 $\alpha 1$ (残基 15~23)、 $\alpha 2$ (残基 29~46)、 $\alpha 3$ (残基 52~59)、 $\alpha 4$ (残基 69~86)、 $\alpha 5$ (残基 90~99)及 $\alpha 6$ (残基 104~114)。 $\beta 1$ 通过一段柔性无

规肽链与 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 相连, $\alpha 1$ 与 $\alpha 2$ 呈约 60° 夹角排布, 使 $\alpha 1$ 以“托举”方式支撑 $\beta 1$, 共同形成一个典型的带状-螺旋-螺旋 (ribbon-helix-helix, RHH) 结构域^[14]。结构分析表明, 该蛋白以二聚体形式发挥作用, N 端存在 RHH 结构域, 即典型的 RHH₂ 架构。作为一种经典的 DNA 结合结构域, RHH 结构域的存在提示 AcrIE10 蛋白可能具备 DNA 结合能力。此外, 结合

AcrIE10 蛋白的表面静电势图 (图 4C) 可见, C 端结构域主要呈现负电性区域 (红色区域), 能够排斥带负电的分子; 而正电性区域 (蓝色区域) 则主要集中在 N 端结构域。核酸分子携带负电荷, 更易与带正电的蓝色区域结合。上述结果进一步提示, AcrIE10 蛋白的 N 端结构域可能为其核酸底物的结合区域。



A: Overall schematic diagram of AcrIE10; B: Cartoon representation of crystal structural of AcrIE10; C: Surface electrostatic potential maps of AcrIE10 monomers and dimers (red areas: electron-rich regions, repelling positive charges; blue areas: electron-deficient regions, attracting positive charges).

图 4 AcrIE10 晶体结构特征分析

Fig 4 Analysis of the structural characteristics of AcrIE10

讨 论

Acr 蛋白是一类由可移动遗传元件 (mobile genetic element, MGE) 编码的一类小分子蛋白, 能特异性抑制某一类型的 CRISPR-Cas 系统。研究表明, 所有已知的 Acr 蛋白长度都小于 140 个氨基酸, 且未发现 Acr 蛋白间的序列与结构相似性, 说明不同 Acr 家族可能具有独立的进化起源^[9]。

Acr 蛋白的多样性和序列非保守性使得新型

Acr 蛋白的预测充满挑战。Acr 下游存在一个保守基因, 称为抗 CRISPR 相关基因 (anti-CRISPR associated, *aca*)。Aca 蛋白在包括前噬菌体在内的多种 MGE 中高度保守, 已成为鉴定新型 Acr 蛋白的关键标志。目前已知 13 个 Aca 蛋白的 N 端含有螺旋-转角-螺旋 (helix-turn-helix, HTH) DNA 结合结构域, 通过与 *acr-aca* 基因簇的启动子区域结合, 抑制下游基因的表达, 从而发挥对相关 Acr 蛋白的转录调控^[15]。尽管 Aca 蛋白通常编码在相应 Acr 蛋白的下游, 但是在众多 Acr 蛋白中还存在一类特殊的

双功能Acr蛋白。这类蛋白不仅能够抑制CRISPR-Cas系统发挥Acr功能,还具备HTH结构域,发挥转录调控功能。目前已知的双功能Acr蛋白包括AcrIIA1^[16]、AcrIIA6^[17]、AcrIIA13^[18]、AcrIIA14^[19]、AcrIIA15^[12]和AcrIF24^[20]。

蛋白质是生命活动的主要承担者,而蛋白质的结构又是其功能的基础^[21]。结构生物学的方法是研究蛋白质、小分子、核酸等物质功能的重要手段。本研究通过X射线衍射技术,首次解析了AcrIE10蛋白单体的晶体结构,该蛋白以同源二聚体的形式组装,其N端结构域由1个 β -折叠片和2个 α -螺旋构成经典的RHH结构域,RHH转录因子超家族具有保守的蛋白-DNA相互作用^[22],利用保守的三维结构基序以序列特异性的方式与DNA结合。这个功能多样的蛋白超家族调控基因的转录,涉及金属的摄取、氨基酸的生物合成、细胞分裂、质粒拷贝数的控制、噬菌体的裂解周期以及许多其他细胞过程^[23-24]。由此推测,除了抗CRISPR-Cas系统的功能之外,AcrIE10可能还通过相关的转录调控功能来精密调控上游相关基因的表达,从而帮助细菌宿主应对不断变化的环境。HTH结构域与RHH结构域同属经典的具备转录调控功能的结构域,基于AcrIE10蛋白晶体结构的解析,发现其含有RHH结构域,提示AcrIE10可能是一个兼具抗CRISPR功能和Aca转录调控功能的双功能Acr蛋白,该结构的解析不仅为深入研究AcrIE10拮抗CRISPR-Cas系统的分子机制提供了基础,同时其N端RHH转录调控结构域的发现,也为深入探索AcrIE10的生物学功能奠定了结构基础。后续我们将开展深入研究,确定AcrIE10的DNA结合位点,评估其对 acr 基因簇的转录调控作用。

本研究通过构建AcrIE10的原核表达体系,应用Ni-NTA亲和层析、凝胶过滤层析等纯化方法,得到高浓度AcrIE10蛋白,并通过X射线衍射解析出AcrIE10蛋白单体的晶体结构,发现其N端具有RHH结构域,为后续进一步研究AcrIE10参与的生物学过程以及具体分子机制奠定了结构基础。

作者贡献声明 杨杨 试验操作,论文撰写。徐蔚腾 蛋白晶体结构解析。王楚宁,李丹,徐晓刚,麻锦彪,王明贵 研究指导,论文修订。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Hille F, Richterr H, Wong SP, *et al.* The biology of CRISPR-Cas: backward and forward [J]. *Cell*, 2018, 172(6):1239-1259.
- [2] Hu Y, Jiang J, Wang D, *et al.* Coexistence of bla (KPC)-IncFII plasmids and type I-E(×) CRISPR-Cas systems in ST15 *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14:1125531.
- [3] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, *et al.* Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(6):467-477.
- [4] Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, *et al.* Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system [J]. *Nature*, 2013, 493(7432):429-432.
- [5] Davidson AR, Lu WT, Stanley SY, *et al.* Anti-CRISPRs: Protein Inhibitors of CRISPR-Cas Systems [J]. *Annu Rev Biochem*, 2020, 89:309-332.
- [6] Bondy-Denomy J, Garcia B, Strum S, *et al.* Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR proteins [J]. *Nature*, 2015, 526(7571):136-139.
- [7] Dong C, Wang X, Ma C, *et al.* Anti-CRISPRdb v2.2: an online repository of anti-CRISPR proteins including information on inhibitory mechanisms, activities and neighbors of curated anti-CRISPR proteins [J]. *Database (Oxford)*, 2022, 2022:baac010.
- [8] Deng X, Sun W, Li X, *et al.* An anti-CRISPR that represses its own transcription while blocking Cas9-target DNA binding [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1):1806.
- [9] Shehreen S, Birkholz N, Fineran PC, *et al.* Widespread repression of anti-CRISPR production by anti-CRISPR-associated proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(15):8615-8625.
- [10] Borges AL, Davidson AR, Bondy-Denomy J. The discovery, mechanisms, and evolutionary impact of anti-CRISPRs [J]. *Annu Rev Virol*, 2017, 4(1):37-59.
- [11] Jiang C, Yu C, Sun S, *et al.* A new anti-CRISPR gene promotes the spread of drug-resistance plasmids in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(14):8370-8384.
- [12] Wang C, Sun Z, Hu Y, *et al.* A novel anti-CRISPR AcrIE9.2 is associated with dissemination of bla (KPC) plasmids in *klebsiella pneumoniae* sequence type 15 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2023, 67(4):e0154722.
- [13] Zhou Y, Tang Y, Fu P, *et al.* The type I-E CRISPR-Cas system influences the acquisition of bla (KPC) -IncF plasmid in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1):1011-1022.