

炭疽芽孢杆菌致死因子突变株 K518E 和 L519C 的筛选及活性分析*

封纯芳²⁾ 吴高兵²⁾ 曹 莎²⁾ 刘子铎²⁾ 洪玉枝^{1, 2)**}

(¹⁾ 华中农业大学植物科学与技术学院, 武汉 430070; ²⁾ 华中农业大学, 农业微生物国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要 为研究炭疽毒素致死因子(lethal factor, LF)致死机理, 更有效地防治炭疽, 对 LF 基因 1 550~2 324 bp 之间的片段进行了随机突变实验. 通过细胞毒性实验筛选 LF 突变体库, 结果获得 5 株活性降低突变体. 进一步对单点突变体蛋白进行亲和纯化, 首次得到了 K518E、L519C 两种突变蛋白, 对其进行纯蛋白活性检测和竞争抑制实验, 发现这两种突变蛋白活性显著降低, 表明 518 位赖氨酸和 519 位亮氨酸对 LF 功能起着非常重要的作用. 并且发现, K518E 对野生型 LF 具有一定的抑制作用, 对 LF 作用机理的研究有一定帮助.

关键词 炭疽, 致死因子, 随机突变, 细胞毒性实验

学科分类号 Q7, Q55

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00152

炭疽毒素蛋白是炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)致病的主要毒力因子之一, 它包括保护性抗原(protective antigen, PA)、致死因子(lethal factor, LF)和水肿因子(edema factor, EF)三个组分, 保护性抗原与水肿因子结合成水肿毒素(EF + PA, ET)或与致死因子结合成致死毒素(LF+PA, LT), 产生毒素效应. 其中 PA 是细胞结合部分, 将 LF 和 EF 转运进细胞内. LF 和 EF 是酶活性部分: EF 能迅速提高细胞内 cAMP 水平造成水肿. LF 是 Zn²⁺ 依赖的金属蛋白酶^[1], LF 特异性裂解多个丝裂原活化蛋白激酶激酶(MAPKK)的 N 端, 从而阻断 MAPK 信号转导途径, 包括 ERK (extracellular signal-regulated kinase), p38MAPK and JNK (c-Jun N-terminal kinase) 途径, 导致细胞死亡^[2].

炭疽毒素蛋白致病机理是: 完整的 PA(PA83)与炭疽细胞表面受体 ATR(anthrax toxin receptor)结合, 被 furin 蛋白酶切割, 游离出 20 ku 大小的一个片段, 剩余 PA63 形成七聚体再与 LF 或者 EF 结合, 通过内吞作用将 LF、EF 转移进细胞内, 发挥蛋白酶的作用^[3]. 由此可见, LF 是导致细胞死亡、炭疽致命的关键因子, 阻断 LF 进入细胞或者 LF 失去酶活性, 都是治疗炭疽的途径^[3, 4].

LF 全长 776 个氨基酸, 相对分子质量为 90 ku, LF 晶体结构含有 4 个结构域: 结构域 I

(1~260 aa)与 EF 竞争性地与 PA 结合; 结构域 II (263~297, 380~550 aa)与结构域 III (303~382 aa)、结构域 IV (552~776aa)包裹在一起, 形成一个深沟, 容纳 MAPKK 的 N 端尾巴; 结构域 IV 是催化中心^[5]. 本研究对 LF 基因的 1 550~2 324 bp (517~776 aa)之间的基因片段进行随机突变, 筛选突变体库, 并对获得的突变体蛋白进行细胞毒性实验, 获得 T30、T87 两株毒性完全失活的单点突变体, 为进一步研究 LF 结构域 II 的功能提供依据, 为治疗炭疽、研究炭疽致病机理, 获得无毒、安全的炭疽疫苗提供一定的基础.

1 材料和方法

1.1 材料

含 PA 基因的质粒 pGEX-6p-pag(华中农业大学植物科学与技术学院构建, 用于纯化 PA 蛋白); 含 lef 基因的质粒 pGEX-6p-lef(华中农业大学植物科学与技术学院构建); 表达载体 pET-28(a) (Novagen 公司); *E. coli* DH5 α 菌用于克隆(华中农业大学植物科学与技术学院保存), *E. coli* BL21-

* 教育部重大项目基金资助(306013).

** 通讯联系人. Tel: 027-87281429, Fax: 027-87280670

E-mail: hyz@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2009-03-16, 接受日期: 2009-06-15

CodonPlus (DE3)-RIL 是经密码子优化的, 共表达 Arg、Ile、Leu 3 个稀有密码子的 tRNA, 用于表达纯化 PA、LF 基因, 购自美国 Stratagene 公司; T7 噬菌体(Novagen 公司); 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 (ATCC Number: TIB-71™), 用加有 10%新生牛血清的 DMEM 培养液培养(新生牛血清购自杭州四季青有限公司, DMEM 培养基购自武汉天源生物技术有限公司); Ni-NTA His•Bind Resins 用于纯化上清液中 LF 蛋白, 购自 Novagen 公司; 限制酶、DNA 聚合酶、T4 连接酶购自 TaKaRa 公司; DNA 胶回收试剂盒、Bradford 试剂盒购自上海生工生物技术有限公司。

1.2 LF 表达质粒构建

用 PCR 法从质粒 pGEX-6p-lef 上扩出 LF 编码序列 lef, 正向引物 F(5'→3'): GAA TGG ATC CGC GGG CGG TCA TGG TG; 反向引物 R(5'→3'): CCA AGA GCT CGC TCA TTA TGA G, 引物带有 BamH I 和 Sac I 位点(用下划线标注), 用 BamH I 和 Sac I 双酶切 lef 片段和载体 pET-28(a). 将处理好的载体和片段用 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜, 转化 *E. coli* DH5α 菌. 用含卡那霉素的平板筛选阳性克隆, 酶切 pET-28(a)-lef 鉴定阳性克隆, DNA 测序鉴定(华大基因公司)。

采用重叠延伸 PCR 的方法对 lef 基因的 1 536、1 539 和 1 540 位点进行定点突变, 引入 Kpn I 位点, 用于后面的随机突变. 第一次 PCR: 以含有 lef 基因的 pET-28(a)-lef 质粒 DNA 为模板, 分别用上述正向引物 F 与带有突变位点的反向引物 R-mutation (GCT TTC CAT TTT CTA GGT ACC CTG CTC)和带有突变位点的正向引物 F-mutation (GAT ACT CGA GCA GGG TAC CTA GAA AAT G)与上述反向引物 R 进行第一次 PCR 扩增(下划线位点为突变后碱基), PCR 产物用 DNA 胶回收试剂盒回收纯化. 第二次 PCR: 以第一次 PCR 回收得到的 2 个 DNA 片段混合物为模板, 用 lef 基因的正向引物和反向引物, 扩增出一条完整的带有 Kpn I 位点的 lef 基因, 克隆至 pET-28(a)上, 转化至 *E. coli* DH5α.

1.3 LF 诱导表达

将 pET-28(a)-lef/ Kpn I 转化到表达菌株 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL. 将带有表达质粒 pET-28(a)-lef 的 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 菌株, 在含有 100 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中培养过夜. 按 3%的比例转接过夜培养物于新鲜的 LB 培

养基中, 200 r/min, 培养至 $A_{600}=0.6$, 加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 28℃ 诱导 4 h, 10% SDS-PAGE 检测诱导结果.

1.4 随机突变体库构建

利用 Clontech 的 Diversify™ 随机突变试剂盒对 LF 进行随机突变. 以 pET-28(a)-lef/ Kpn I 为模板, F-mutation 为正向引物和反向引物 R, 进行 PCR 扩增, 反应体系和条件见参考文献[6]. 将 PCR 产物和 pET-28(a)-lef/ Kpn I 用 Kpn I 和 Sac I 双酶切, 将突变后的基因片段重新克隆至 pET-28(a).

1.5 突变体文库筛选

按上述条件诱导 LF 及其突变体蛋白表达后, 加入 10 μl T7 噬菌体, 37℃ 孵育 2~3 h, 裂解大肠杆菌菌体. 12 000 r/min, 10 min 离心裂解液, 上清中含有目的蛋白.

接种小鼠巨噬细胞 RAW264.7 于 96 孔培养板中培养至 90%满, 约 16 h, 倒掉培养液, 每孔加入 90 μl 新鲜培养液(含 1 mg/L rPA, rPA 为华中农业大学植物科学与技术学院制备, 见参考文献[7])和 10 μl 的重组 LF 或突变体的裂解液上清. 37℃ 孵育 4 h, 每孔加入 10 μl alamarBlue™ (AbD Serotec)染料. 37℃ 培养 4 h, 用酶标仪在激发光 530 nm, 发射光 590 nm 条件下读数, 细胞存活率计算方法见说明书.

1.6 LF 及其突变体蛋白纯化

LF 及其突变体蛋白诱导表达条件同上, 收集菌体, 用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 菌体重悬于 1×结合缓冲液(0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L imidazole, pH 7.9), 高压破碎细胞, 12 000 r/min, 4℃, 离心 30 min, 上清液中含有目的蛋白, 通过 Ni-NTA 金属螯合 His 蛋白纯化树脂纯化目的蛋白.

混匀树脂, 缓慢加入 2 ml 树脂至纯化柱中, 树脂沉淀形成柱床后加入 3 倍体积的 1×结合缓冲液. 当结合缓冲液落到柱床顶端时, 加入预先准备好的高压破碎液上清液, 流速控制在 1 ml/min. 上清液过柱完成后, 加入 10 倍体积的 1×结合缓冲液洗涤柱床, 然后再加入 6 倍体积的 1×洗涤液(0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 60 mmol/L imidazole, pH 7.9)洗掉杂蛋白. 最后分别用 1×洗脱液(0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L imidazole, pH 7.9): 1×结合缓冲液 = 1:9, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:0 依次洗脱目的蛋白, 收集含目的蛋白的洗脱液, 选择最佳洗脱比例. 10%

SDS-PAGE 分析纯化结果, 用 PBS 缓冲液透析 3 天, 间隔 2~3 h 更换一次透析液, Bradford 试剂盒检测蛋白质浓度。

1.7 Western blot 分析

将上述纯化蛋白电转移至 PVDF 膜上, 5%脱脂牛奶封闭过夜, 依次加入华中农业大学植物科学与技术学院自制的兔抗 LF 血清和 HRP 标记的羊抗兔 IgG (Sigma 公司)的二抗, 在联苯胺(DAB)溶液中显色并观察杂交结果。

1.8 体外细胞活性检测

将 LF 和突变体蛋白稀释至终浓度 0.005、0.05、0.5、1、1.5、2、2.5、5、7.5 和 10 mg/L, 细胞毒性实验检测蛋白质活性, 方法同 1.5 突变体筛选。

1.9 竞争抑制实验

将小鼠巨噬细胞 RAW264.7 接种于 96 孔培养板中培养至 90%满, 约 16 h, 倒掉培养液, 每孔加入 90 μ l 含有 1 mg/L rPA 和 1.5 mg/L rLF 新鲜细胞培养液中, 按野生型与突变体 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 的比例添加突变体蛋白, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 每孔加入 10 μ l alamarBlue™ (AbD Serotec) 染料。37 $^{\circ}$ C 培养 4 h, 用酶标仪在激发光 530 nm, 发射光 590 nm 条件下读数, 计算细胞存活率。

2 结 果

2.1 表达质粒构建

通过 PCR 扩增方法将 LF 基因克隆至表达载体 pET-28(a)上(图 1), 酶切鉴定后, 进行序列测定, 证明 LF 基因与 GenBank(Accession No. M29081)序列完全一致。

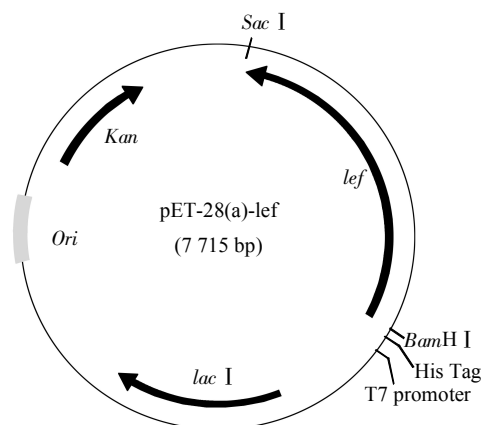


Fig. 1 Construction of pET-28(a)-lef expression vector

为对 *lef* 合适基因片段进行突变分析, 我们通过重叠 PCR 对 *lef* 的 1 536、1 539 和 1 540 三个位

点进行突变, 0.7%琼脂糖凝胶电泳检测第一轮和第二轮 PCR 产物(图 2), 然后将拼接后 DNA 片段克隆到 pET-28(a)上。突变前后 *lef* 编码的氨基酸序列没有改变, 基因水平上引入 *Kpn* I 位点, 用于构建随机突变。 *Kpn* I 酶切检测后, 进行序列测定, 结果表明所用突变位点和基因片段准确无误。细胞活性检测表明, 引入 *Kpn* I 位点对 pET28(a)-*lef* 活性没有影响(见 2.3)。

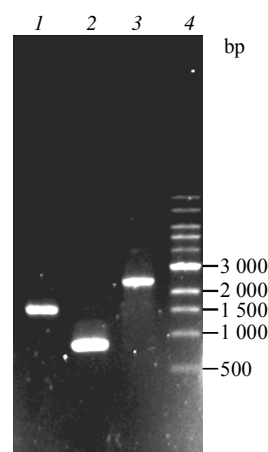


Fig. 2 Overlap PCR products

1: The first round PCR products(1 550 bp); 2: The first round PCR products(790 bp); 3: The second round PCR products(2 340 bp); 4: DNA marker.

2.2 LF 诱导条件确定

我们将过夜培养物按 3%的比例转接, 37 $^{\circ}$ C 培养 2.5 h 后, 在培养物中加入 IPTG 使其终浓度为 0.2 mmol/L, 28 $^{\circ}$ C 条件下培养 6 h, 诱导 LF 表达。12% SDS-PAGE 检测 LF 表达, 结果表明, LF 在 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 中可溶性表达, 目标蛋白基本都位于上清液中(图 3)。

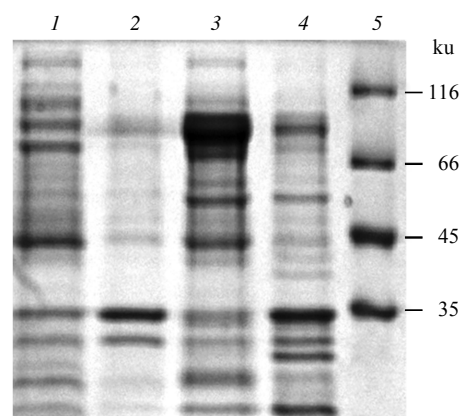


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant protein

1: The supernatant of uninduced strains; 2: The pellet of uninduced strains; 3: The supernatant of induced expression pET-28(a)-lef; 4: The pellet of induced expression pET-28(a)-lef. 5: Molecular mass marker. The molecular mass of LF was 90 ku and soluble expressed.

2.3 突变体初筛结果

LF 在大肠杆菌中可溶性表达，经 T7 噬菌体裂解后离心，LF 蛋白位于上清液中。用细胞毒性检测的方法对裂解液中 LF 活性进行检测，初步筛选随机突变体文库。本研究中，我们筛选了突变体库中 160 株突变体，结果发现 5 株突变体的裂解液加

入到含有 PA 的细胞培养液中培养细胞，细胞仍然存活，表明这些突变株活性降低或者完全丧失活性(图 4)，测序表明这些突变体个别碱基发生突变(表 1)。为进一步检验突变株活性和方便研究，我们对单点突变的 T30 和 T87 突变蛋白进行了纯化，并检测纯蛋白的活性。

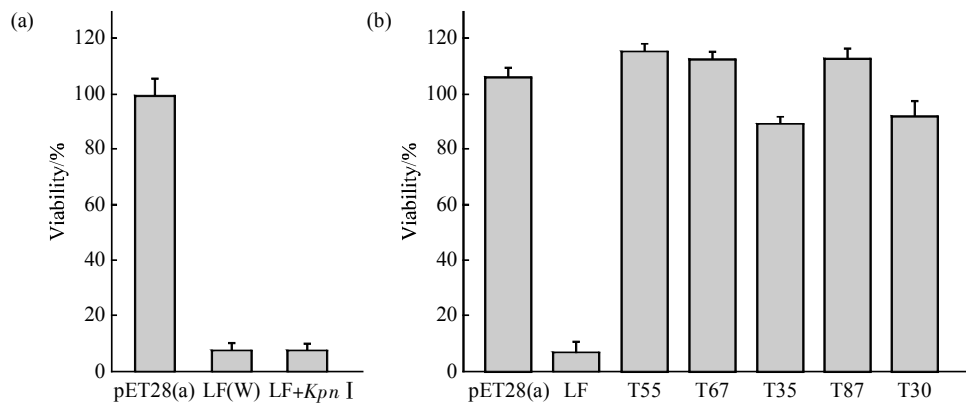


Fig. 4 Determining the activity of pET-28(a)-lef/Kpn I (a) and scanning the library of LF mutants (b)
(a) To facilitate the following random mutation, the special bases were transferred to *Kpn* I site by overlapping PCR and the cytotoxicity assay showed the *Kpn* I site didn't affect the biological activities. (b) The activities of five mutants shown in Figure 4b were lost or lower than wild type LF when scanning the library of mutants.

Table 1 Results of sequence analysis of mutants			
Mutants	Sites of gene	Sites of amino acids	Lie on crystal structure
T30	A-1552-G	K-518-E	Domain II
T87	T-1556-C	L-519-C	Domain II
T35	A-1622-G	E-541-G	Domain II, IV
	A-2027-G	E-676-G	
T55	A-1565-G	Q-522-R	Domain II, IV
	G-2048-A	G-683-D	
T67	A-1961-G	H-654-R	Domain IV
	A-2045-G	E-682-R	

2.4 LF 及其单点突变体蛋白纯化

Ni 亲和层析法纯化 LF 及单点突变体的突变蛋白，12% SDS-PAGE 和 Bandsan5.0 分析表明，rLF 及其突变体纯度达 90%以上(图 5a)，进一步进行 Western blot 分析(图 5b)。

2.5 LF 单点突变体活性鉴定

通过体外细胞毒性实验，证明 LF 的两株单点突变的突变株 T30(K518E)和 T87(L519C)致死活性显著降低。野生型 LF 蛋白浓度为 1.5 mg/L 时，产生完全致死活性，而突变体蛋白浓度达到 10 mg/L 时，T30 的细胞存活率约 60%，T87 仍没有显著的

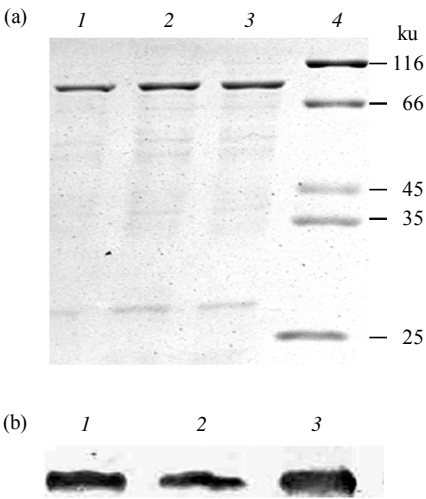


Fig. 5 SDS-PAGE and Western blot analysis for purification of rLF, T30 and T87
(a) SDS-PAGE analysis 1: rLF; 2: T30; 3: T87; 4: Protein molecular mass marker. (b) Western blot analysis 1: rLF; 2: T30; 3: T87.

致死效率，细胞存活率 90%左右(图 6)。这些突变株为进一步研究炭疽毒素致死机理和防治炭疽病奠定了一定的基础。

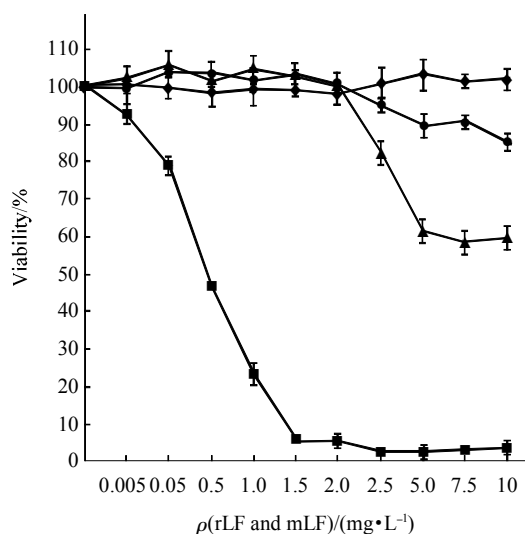


Fig. 6 Cytotoxicity assay of purified rLF and its mutant proteins on RAW264.7 cells

Cells grown overnight in 96-well plates were treated with varying concentrations of LF or its mutant proteins along with 1 mg/L of PA. After 3 h of incubation, cell viability was determined by using alamarBlue™ dye as described under **Materials and methods**. Compared with the anthrax toxin (LF+PA) and PA, T30 (K518E) and T87 (L519C) lost activities significantly. ■—■: LF + PA; ▲—▲: T30 + PA; ●—●: T87 + PA; ◆—◆: PA.

2.6 竞争抑制实验

体外竞争抑制实验发现, T30(K518E)与野生型 LF 浓度比例大于 10 时, 具有较明显的竞争抑制作用, 细胞存活率在 60%左右. T87 (L519C)竞争作用非常弱, 与野生型浓度比例达到 20 时, 细胞存活率仅为 30%左右.

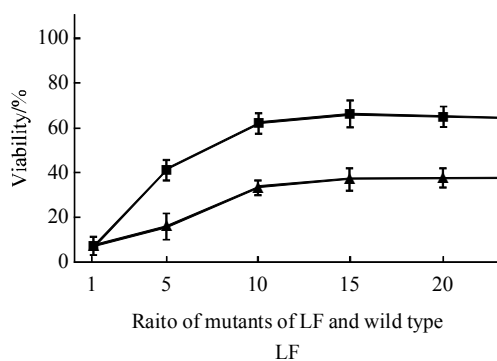


Fig. 7 Competition inhibition assay of the mutant T30 and T87 protein

Competition inhibition assay was demonstrated by added constant LF and PA, and a serial of mutants of LF. When the ratio of T30(K518E) and rLF was up to 10, the viability of cells was 60%; however, T87 (L519C) almost didn't inhibit the rLF activities while the ratio of T87 (L519C) and rLF was 20. ■—■: T30(K518E); ▲—▲: T87(L519C).

3 讨 论

炭疽是由炭疽芽胞杆菌引起的人畜共患的烈性传染病, 对人类和畜牧业造成严重的危害, 其致病因子主要有炭疽荚膜和炭疽毒素. 炭疽荚膜帮助细菌逃避宿主免疫系统的防御, 炭疽毒素是炭疽的致病因子, 目前炭疽毒素进入细胞的过程已经清楚, 但是对致死因子 LF 的研究报道较少, 对 LF 作用机制还不清楚^[8,9]. 对 LF 研究较多的是 LF 结构域Ⅳ的生物催化中心, 对 LF 活性起着非常重要的作用. 通过结构分析表明, 结构域Ⅳ部分序列与结构域Ⅰ类似^[9], 680~725 位氨基酸残基与结构域Ⅰ110~150 位氨基酸残基序列和结构上都具有相似性, 推断结构域Ⅳ的 710~756 位氨基酸残基参与了与 PA 的结合^[10]. 因此, 为进一步研究 LF 结构与功能的关系, 本研究对 LF 的催化中心结构域Ⅳ和结构域Ⅱ部分区域(517~550 aa)进行了随机突变. 通过筛选、细胞毒性实验, 首次得到了 K518E 和 L519P 两株活性完全丧失的单点突变株, 突变位点均位于结构域Ⅱ, 根据 LF 晶体结构分析, 518 和 519 位氨基酸位于结构域Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ包裹在一起形成的腔的顶部(图 8). 结构域Ⅱ与来源于蜡状芽胞杆菌的一种核糖化毒素(ADP ribosylating toxins)VIP2 结构类似, 但是核糖化毒素家族中保守的谷氨酸在 LF 被 518 位的赖氨酸代替^[9], 而本研究中获得的 518 位突变株 K518E 基本丧失活性,

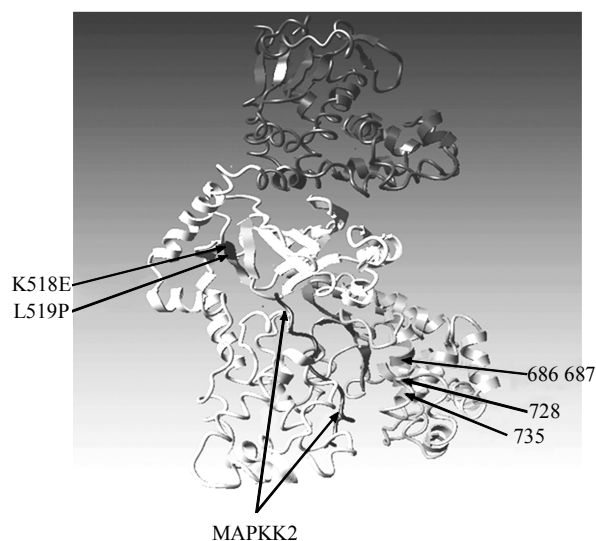


Fig. 8 The crystal structure of LF and MAPKK2

The two mutant sites K518E and L519P located on the top of the groove and played an important role in the function of LF. The substrate MAPKK2 and the site of zinc-binding consensus motif (HEXXH: His-686, His-687, Tyr-728 and Glu-735) were also shown.

这说明 K518E 对 LF 结构和功能方面具有非常重要的作用。另一株与其紧邻的 Leu519 突变为 Pro 活性显著降低,表明 519 位亮氨酸作用也很重要。

对 K518E 和 L519C 进行竞争性抑制实验发现, K518E 具有较强的抑制作用而与其相邻的 L519C 却没有发现抑制作用。研究表明, LF 结构域 I 是与 PA 结合的区域, LF N 端 1~254 个氨基酸(LFN)单独具有完整的与 PA 结合的功能,并且与其他蛋白融合可以将其转运进细胞内^[1],而本实验中所得突变体 LF 结构域 I 均为野生型,同样应该具有完整的结合、转运功能。据此,我们推断突变体 LF 可以转运进细胞内,在细胞内野生型 LF 与突变体 LF 竞争性地与底物 MAPKK 相互作用。结构域 II、III、IV 包裹在一起形成一个带有负电荷的深沟(图 8),518 和 519 位氨基酸位于沟的顶部,野生型 518 赖氨酸带有正电荷对维持负电荷深沟构象的稳定性可能起到一定的作用,从而影响与底物 MAPKK LF 的相互作用^[9]。519 位 Leu 突变为 Cys 后,对致死活性影响非常大,但却不具有抑制作用,仍需进一步研究。

LF 是炭疽毒素主要免疫原之一,为了诱导全面的免疫反应,炭疽蛋白疫苗主要以无毒的 LF 突变蛋白和 PA 或失活的 PA 和 LF 为基础^[12],无活性的 LF 突变体蛋白竞争性地与 PA 结合,可以抑制炭疽,达到治疗炭疽的目的。这些位点突变导致 LF 完全丧失活性,可能是阻碍了 LF 与 Zn²⁺ 结合或与底物 MAPKK 的相互作用^[13],原因还有待进一步研究。尽管如此,这些突变体的发现对治疗炭疽病、研制新型的炭疽疫苗和进一步了解 LF 致病机理有着非常重要的作用和广阔的应用前景。

致谢 感谢华中农业大学农业微生物国家重点实验室郭爱珍教授的悉心指导!

参 考 文 献

1 Zakharova M Y, Dubiley S A, Chudakov D M, *et al.* Substrate

- specificity of the anthrax lethal factor. Dokl Biochem Biophys, 2008, **418**: 14~17
- 2 Cao S, Liu Z, Guo A, *et al.* Efficient production and characterization of *Bacillus anthracis* lethal factor and a novel inactive mutant rLFm-Y236F. Protein Expr Purif, 2008, **59**(1): 25~30
- 3 Rainey G J, Young J A. Antitoxins: novel strategies to target agents of bioterrorism. Nat Rev Microbiol, 2004, **2**(9): 721~726
- 4 Ascenzi P, Visca P, Ippolito G, *et al.* Anthrax toxin: a tripartite lethal combination. FEBS Lett, 2002, **531**(3): 384~388
- 5 Pannifer A D, Wong T Y, Schwarzenbacher R, *et al.* Crystal structure of the anthrax lethal factor. Nature, 2001, **414** (6860): 229~233
- 6 Lin L, Meng X, Liu P, *et al.* Improved catalytic efficiency of endo-beta-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* BME-15 by directed evolution. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, **82**(4): 671~679
- 7 Dian C, Eshaghi S, Urbig T, *et al.* Strategies for the purification and on-column cleavage of glutathione-S-transferase fusion target proteins. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002, **769**(1): 133~144
- 8 董大勇,徐俊杰,陈 薇.炭疽疫苗及治疗药物筛选和评价模型研究进展.生物化学与生物物理进展,2006, **33**(6): 517~523
- 9 Dong D Y, Xu J J, Chen W. Prog Biochem Biophys, 2006, **33**(6): 517~523
- 10 郭 强,徐俊杰,董大勇,等.重组炭疽致死因子的表达及生物活性分析.微生物学报,2004, **44**(6): 749~751
- 11 Guo Q, Xu J J, Dong D Y, *et al.* Acta Micro Biol Sin, 2004, **44**(6): 749~751
- 12 Ren G, Quispe J, Leppla S H, *et al.* Large-scale structural changes accompany binding of lethal factor to anthrax protective antigen: a cryo-electron microscopic study. Structure, 2004, **12**(11): 2059~2066
- 13 Arora N, Leppla S H. Residues 1-254 of anthrax toxin lethal factor are sufficient to cause cellular uptake of fused polypeptides. J Biol Chem, 1993, **268**(5): 3334~33341
- 12 Brey R N. Molecular basis for improved anthrax vaccines. Adv Drug Deliv Rev, 2005, **57**(9): 1266~1292
- 13 Tonello F, Naletto L, Romanello V, *et al.* Tyrosine-728 and glutamic acid-735 are essential for the metalloproteolytic activity of the lethal factor of *Bacillus anthracis*. Biochem Biophys Res Commun, 2004, **313**(3): 496~502

Screening and Activity Analysis of Lethal Factor Mutants——K518E and L519C From *Bacillus anthracis**

FENG Chun-Fang²⁾, WU Gao-Bing²⁾, CAO Sha²⁾, LIU Zi-Duo²⁾, HONG Yu-Zhi^{1, 2)**}

⁽¹⁾ College of Plant Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

⁽²⁾ National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract Anthrax toxin is one of the two virulence factors of *Bacillus anthracis* and it is a binary bacterium toxin composed of protective antigen (PA), lethal factor (LF) and edema toxin (EF). Among of them, LF is the enzyme moiety lead to the death of the cell. To investigate key function amino acid of LF and study the lethal mechanism of lethal factor, random mutagenesis was carried out. The mutation library of the 774 bp fragment of lethal factor from site 1 550 to 2 324 bp was constructed using DiversifyTM PCR Random Mutagenesis Kit (Clontech) with some modification. Transformants of *lef* mutation library were induced by 0.2 mmol/L IPTG at 28°C for 4 h and then T7 phage were added into the culture, incubating for further 2~3 h to lyse the bacterium. The lysis was centrifuged at 12 000 r/min for 8 min and the supernatant which contained the target protein was collected. To determine the activity of the mutants, the cell cytotoxicity assay was carried out. RAW 264.7 macrophage cells were seeded into 96-well plates, 24 h ahead of experiments. When assaying, the medium was removed and 100 µl DMEM medium containing 1.0 mg/L of purified recombinant and 10 µl of the lysis supernatant was added into each well. Then the plates were incubated at 37°C for 4 h. The cell viability was determined by using the alamarBlueTM (AbD Serotec) dye according to the manufacturer's direction. The mutants whose activities had decreased significantly were sequenced and further purified by Ni-histidine tag affinity chromatography. The cell cytotoxicity and competition binding assay were demonstrated to analyse the character of the mutants. Five mutants which had low biological activity determined through the cell cytotoxicity assay were obtained. Furthermore, two mutant proteins with single-site mutation, K518E and L519C, were purified for the first time. The cytotoxicity assay showed that the two mutant proteins lost activity significantly, that means, Lys518 and Leu519 played an important role in the function of lethal factor. The competition binding assay showed K518E endowed with the character of competition inhibition of wild type LF, whereas L519C doesn't have the character. Probably, mutant K518E change Lys into Glu carrying negative charge and affects the catalytic groove of LF which is negative charge. Therefore, Lys 518 maybe has an important role to stabilize the conformation of LF and combine the substrate.

Key words anthrax, lethal factor, random mutation, cytotoxicity assay

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00152

*This work was supported by a grant from The Key Project of Chinese Ministry of Education(306013).

**Corresponding author.

Tel: 86-27-87281429, Fax: 86-27-87280670, E-mail: hyz@mail.hzau.edu.cn

Received: March 16, 2009 Accepted: June 15, 2009