

肺炎链球菌烯醇化酶与热休克蛋白 DnaJ 的结合及结合位点鉴定

王建敏¹, 马 峰², 徐红梅¹, 王丽滨¹, 邢 燕², 粟玉凤¹, 张雪梅¹, 王 虹¹

(1. 重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学第一临床学院, 重庆 400016)

【摘要】目的:明确肺炎链球菌糖酵解关键酶烯醇化酶(enolase, Eno)和热休克蛋白 DnaJ 是否有直接结合及结合位点。**方法:**原核表达并纯化 Eno 全长蛋白, 鉴定其酶活性, 利用重组 Eno 蛋白皮下免疫昆明小鼠制备特异性抗血清, 分析其胞外分泌情况; 采用生物膜层干涉(biolayer interferometry, BLI)技术和直接结合实验鉴定 Eno 和 DnaJ 两者之间是否存在直接相互作用; 在前者结果阳性的基础上, 截短表达 Eno 蛋白, 通过直接结合实验鉴定 Eno 蛋白结合 DnaJ 的位点。**结果:**成功表达重组 Eno 蛋白, 纯度达 90%, 该蛋白具有酶活性; 重组 Eno 蛋白皮下免疫昆明小鼠后, 获得效价达 $1:7.68 \times 10^6$ 的特异性抗血清; Western blot 分析显示, 7 种不同血清型肺炎链球菌培养上清中均在分子量约 47 kD 处出现特异性反应带; 直接结合试验显示, 随着 Eno 蛋白浓度增加, Eno 与 DnaJ 的结合量也相应增加($r=0.920, P=0.000$), 其吸光度值从 0.222 ± 0.042 ($12.5 \mu\text{g/ml}$) 增加到 0.569 ± 0.099 ($200.0 \mu\text{g/ml}$); BLI 技术测定两者结合的亲和常数为 926 nmol/L; 截短的 Eno(aa1~aa100)与 DnaJ 的结合量 2.25 ± 0.38 高于其他截短序列的结合量 $0.94 \pm 0.25, 1.08 \pm 0.09, 0.75 \pm 0.12$, 差异具有统计学意义($P=0.000, P=0.001, P=0.000$)。**结论:**肺炎链球菌 Eno 蛋白与 DnaJ 蛋白存在直接结合作用, 结合位点主要位于其 N 端的 1~100 个氨基酸序列。

【关键词】肺炎链球菌; 烯醇化酶; DnaJ; 蛋白相互作用

【中图分类号】R372; R378.14

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-12-25

Determination of binding sites between heat shock protein DnaJ and enolase in *Streptococcus pneumoniae*

Wang Jianmin¹, Ma Feng², Xu Hongmei¹, Wang Libin¹, Xing Yan², Su Yufeng¹, Zhang Xuemei¹, Wang Hong¹

(1. Key Laboratory of Diagnostics Founded by Ministry of Education, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University; 2. The First Clinical Medical College of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To determine whether the key glycolytic enzyme enolase(Eno) bind heat shock protein DnaJ directly and to analyze the binding sites between DnaJ and Eno in *Streptococcus pneumoniae* (*S.pneumoniae*). **Methods:** Recombinant Eno protein was obtained through prokaryotic expression system, and its α -enolase activity was analyzed. Kunming mice were immunized with the recombinant protein to prepare the polyclonal antibody to Eno protein and the titer of the antibody was determined by ELISA. The expression levels of Eno protein in *S.pneumoniae* with different serotypes were determined by Western blot. The direct interaction between DnaJ and Eno was determined by biolayer interferometry (BLI) technology and direct binding assay. Truncated Eno protein was expressed and purified, and the binding sites of DnaJ on Eno were determined by direct binding assay. **Results:** The recombinant protein Eno with high purity (about 90%) was obtained after purification of Ni affinity chromatography and exhibited α -enolase activity. The antibody titer of anti-Eno in the immunized mice serum reached to 7.68×10^6 . Western blot showed the same band with Mr 47 000 presented in the supernatant of all the 7 serotypes of *S.pneumoniae*. The direct binding assay demonstrated that DnaJ bound Eno in a dose-dependent manner ($r=0.920, P=0.000$) and a concentration dependent binding of Eno to immobilized DnaJ was detected ($KD=926 \text{ nmol/L}$) by BLI. Binding experiments demonstrated that DnaJ bound more truncated Eno (aa1-aa100) (2.25 ± 0.38) than

the other truncated Eno proteins (0.94 ± 0.25), (1.08 ± 0.09), (0.75 ± 0.12) ($P=0.000, P=0.001, P=0.000$). **Conclusion:** DnaJ interacts with Eno directly in *S.pneumoniae* and primarily via the binding sites, which are localized within 100 aa of the N-terminal domain of Eno.

【Key words】 *Streptococcus pneumoniae*; enolase; DnaJ; protein interaction

作者介绍: 王建敏, Email: 309936877@qq.com,

研究方向: 肺炎链球菌致病机制及蛋白相互作用。

通信作者: 王 虹, Email: wanghongljf@163.com。

基金项目: 重庆市教委第三批重庆市高等学校优秀人才资助计划项目 (编号: 渝教人[2011]32 号)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150414.2210.002.html> (2015-04-14)

DnaJ 蛋白是热休克蛋白(heat shock protein, HSP) 40 家族的一员, 属于分子伴侣蛋白, 可通过提高 HSP70 的 ATPase 活性和促进其与底物的结合, 发挥分子伴侣效应, 在胞内新生蛋白折叠和跨膜运输、蛋白质多聚体结构的装配和解装配以及热刺激时维持蛋白质的特殊构象等过程中发挥重要作用^[1-2]。DnaJ 蛋白广泛存在于各种生物中, 在细菌感染致病过程中发挥了重要作用: 如在大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) 中, dnaJ 基因缺陷后其生长增殖减缓^[3]; 在伤寒沙门菌中, DnaK/DnaJ 为其入侵上皮细胞, 在巨噬细胞内存活所必需^[4]。本课题组的前期研究发现, DnaJ 也显著影响肺炎链球菌的生长繁殖和致病能力^[5], 但其具体机制尚不清楚。

为此, 本课题组通过免疫共沉淀筛选可能与 DnaJ 蛋白有相互作用的蛋白, 从 DnaJ 蛋白对这些相互作用蛋白的调控作用中研究其致病机制。研究发现, 糖酵解关键酶烯醇化酶(enolase, Eno)与 DnaJ 蛋白存在相互作用, 并通过大肠双杂交系统进行了证实^[6]。烯醇化酶是 1 种催化 2-磷酸甘油酸生成磷酸烯醇式丙酮酸的糖酵解酶, 其不仅是肺炎链球菌的 1 个生存必需基因, 也是 1 个具有多功能的重要毒力因子, 在细菌的侵袭以及免疫逃逸过程中发挥重要作用^[7-9]。课题组前期研究发现, 在肺炎链球菌 D39 中缺陷 DnaJ 后, Eno 的表达水平显著下调, 提示 DnaJ 蛋白可能通过调控 Eno 的蛋白水平在细菌的生长繁殖和感染致病中发挥作用^[6]。

为进一步研究这种调控作用的机制及影响因素, DnaJ 与 Eno 是否为直接相互作用, 以及其相互作用的具体位点有待明确。为此, 本研究采用直接结合实验、生物膜层干涉(biolayer interferometry, BLI)技术验证 Eno 和 DnaJ 是否可直接结合, 并进一步通过截短表达的 Eno 分析其与 DnaJ 的结合位点, 为后续的功能研究奠定基础并提供一定的实验支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒 肺炎链球菌 NCTC 7466(D39, serotype 2)购于英国典型菌种保藏中心, TIGR4(serotype 4)购于美国典型微生物菌种保藏中心, CMCC(B)31109(serotype 1)、CMCC(B)31207(serotype 6B)、CMCC(B)31614(serotype 14)、CMCC(B)31693(serotype 19F)、CMCC(B)31759(serotype 23F)

菌株购于中国医学细菌保藏管理中心。以上菌株均培养于 C+Y 半合成培养基^[10]。

原核表达质粒 pET28a、pCold II 购于 Takara 公司, *E. coli* BL21(DE3)感受态为本实验室保存。

1.1.2 实验动物 实验小鼠购买于重庆医科大学实验动物中心, 为 6 周~8 周雌性昆明小鼠, SPF 级。实验动物许可证号为 SYXK(渝)2007-0001。

1.1.3 主要试剂 DNA 纯化试剂盒购自美国罗氏公司, 质粒抽提试剂盒购自美国 Omega 公司; PCR 试剂、高保真 DNA 聚合酶, rTaq 酶、T4 连接酶、限制性内切酶购自宝生物(大连)公司; 配制 Western blot 所需试剂、脱氧胆酸盐购自上海生工生物有限公司; 核糖核酸酶 A、蛋白酶 K、溶菌酶、酵母提取物、胰蛋白胨、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)、酵母 Eno(EC 4.2.1.11)、完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂购自 Sigma; Ni-NTA 亲和层析柱购自 Novagen; 引物合成由上海生工生物有限公司完成; 测序由北京华大有限公司完成; 山羊抗鼠 IgG 二抗购自中杉金桥; 蛋白酶抑制剂混合物为 BBI 产品; DnaJ-flag 蛋白购自重庆泽恒生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因 eno 全长及截短片段的扩增 根据 GenBank 中肺炎链球菌 D39 菌株 eno 基因序列(NC_008533.1)设计引物, 见表 1。D39 用 C+Y 半合成培养基培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.5, 提取基因组 DNA, 作为模板, PCR 扩增 eno 全长及截短片段。扩增体系为: 5×PrimeStar buffer(含 Mg²⁺)10 μl, dNTP (10 mmol/L)4 μl, 上下游引物(10 pmol/L)各 1 μl, D39 基因组 DNA 2 μl, PrimeStar 0.3 μl, ddH₂O 31.7 μl。扩增条件: 98℃变性 10 s, 52℃退火 15 s, 72℃延伸 1 min 40 s, 共 32 个循环; 72℃延伸 5 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 用 DNA 片段纯化试剂盒纯化后保存于-20℃。

1.2.2 重组质粒的构建 eno 全长片段和质粒 pET28a, 经限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 双酶切; eno1~4 截短片段和质粒 pCold II, 经限制性内切酶 Nde I 和 Hind III 双酶切, 回收酶切产物进行连接反应。连接产物转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 铺于含 50 μg/ml 卡那霉素的 Luria-Bertani 抗性平板。阳性克隆经 PCR 和双酶切鉴定正确后, 送测序进一步鉴定。

1.2.3 Eno 全长及截短蛋白的诱导表达和纯化 蛋白诱导表达参照说明书进行, 纯化参照文献进行^[11], Eno 诱导表达条件为 0.05 mmol/L IPTG, 20℃, 120 r/min 诱导 10 h; 由于 T7 系列载体表达截短蛋白时, 蛋白表达量低或呈不可溶性表达, 故截短 Eno 蛋白采用冷休克表达载体 pCold II, 通过低温诱导进行表达, 具体条件如下: 截短 Eno(aa1~aa100)诱导表达条件为 0.2 mmol/L IPTG, 15℃, 120 r/min 诱导 6 h; 截短 Eno(aa1~aa127)诱导表达条件为 0.05 mmol/L IPTG, 15℃, 80 r/min 诱导 6 h; 截短 Eno(aa1~aa322)诱导表达条件为 0.1 mmol/L IPTG, 15℃, 120 r/min 诱导 24 h; 截短 Eno(aa1~aa398)诱导表达条件为 0.2 mmol/L IPTG, 15℃, 120 r/min 诱导 24 h。

表 1 PCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences for PCR

基因名称	引物序列(5'-3')
eno(1025853.1027157)	上游:CGCGGATCCATGTCAATTATTACTGATGTTTACG(<i>Bam</i> H I) 下游:CCGCTCGAGTTATTTTTTAAGGTTGTAGAATGAT(<i>Xho</i> I)
eno1(1025853.1026152)	上游:GGAATTCATATGTCAATTATTACTGATGTTTACG(<i>Nde</i> I) 下游:CCCAAGCTTTTAAGTACCGTCAAGTCCGATCATA(<i>Hid</i> III)
eno2(1025853.1026233)	上游:GGAATTCATATGTCAATTATTACTGATGTTTACG(<i>Nde</i> I) 下游:CCCAAGCTTTTATTCAAGGTAGTCAGCAGCAGCA(<i>Hid</i> III)
eno3(1025853.1026818)	上游:GGAATTCATATGTCAATTATTACTGATGTTTACG(<i>Nde</i> I) 下游:CCCAAGCTTTTATACGAAGAAGTCGTACCAACA(<i>Hid</i> III)
eno4(1025853.1027046)	上游:GGAATTCATATGTCAATTATTACTGATGTTTACG(<i>Nde</i> I) 下游:CCCAAGCTTTTAAAGTGAACCACTCTTGATTTGT(<i>Hid</i> III)

注:_,引物序列所包含的限制性内切酶酶切位点

1.2.4 酶活性测定 测定方法参考文献^[7],24 孔板按 0.5 ml/孔加入含 3 mmol/L 2-磷酸甘油酸的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液(含 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 100 mmol/L,MgCl₂ 10 mmol/L,KCl 7.7 mmol/L,pH 7.0),加入 0、0.312 5、0.625、1.5、2.5 μg 的 Eno 蛋白,37 ℃孵育 3 min,加入 0.5 ml 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应后,240 nm 检测吸光度(absorbance,A)值。酵母 Eno 蛋白作为阳性对照。

1.2.5 Eno 多克隆抗体制备 多克隆抗体制备及效价测定参照文献^[12],初次免疫 Eno 蛋白为 150 μg,完全弗氏佐剂与蛋白溶液按体积 1:1 比例混合;再次和末次免疫蛋白为 75 μg,佐剂换为不完全弗氏佐剂。末次免疫 7 d 后取鼠尾静脉血,分离血清,ELISA 间接法测定效价。

1.2.6 Eno 在肺炎链球菌中分泌保守性评价 7 种不同血清型肺炎链球菌培养至 A_{600 nm}=0.5,6 000 r/min 离心 10 min,收集细菌沉淀和培养上清,进行 Western blot 检测,一抗为鼠抗 Eno 多克隆抗体(1:5 000 稀释),二抗为山羊抗鼠 IgG(1:5 000 稀释),ECL 化学发光检测。

1.2.7 直接结合实验验证 Eno 与 DnaJ 的结合 用 pH9.6 的碳酸钠缓冲液将 DnaJ-flag 蛋白稀释成 5 μg/ml,100 μl/孔加入 96 孔板 4 ℃包被过夜,1%牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)作阴性对照。洗板 3 次,5%脱脂奶粉(溶于含 0.1%吐温-20 的 PBS)200 μl/孔,37 ℃封闭 2 h;洗板 3 次,用封闭液将 Eno 蛋白稀释成不同浓度(12.5 μg/ml~200 μg/ml)的溶液,100 μl/孔,37 ℃孵育 1 h;洗板 3 次,每孔加入 100 μl 鼠抗 Eno 多克隆抗体(1:1 000 稀释),37 ℃孵育 1 h;洗板 6 次,每孔加入 100 μl 羊抗鼠 IgG 二抗(1:5 000 稀释),37 ℃孵育 45 min;洗板 6 次,四甲基联苯胺显色 15 min,每孔加入 100 μl 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应后,450 nm 测 A 值。

1.2.8 直接结合实验鉴定 Eno 与 DnaJ 的结合位点 用 pH9.6 的碳酸钠缓冲液将 DnaJ-flag 蛋白稀释成 5 μg/ml,100 μl/孔加入 96 孔板 4 ℃包被过夜。洗板 3 次,5%脱脂奶粉 200 μl/孔,37 ℃封闭 2 h;洗板 3 次,分别加入各截短 Eno 蛋

白(200 μg/ml),100 μl/孔,37 ℃孵育 1 h;余下方法同“直接结合实验验证 Eno 与 DnaJ 的结合”所述。

1.2.9 BLI 法检测 Eno 和 DnaJ 的结合常数 配制生物素溶液(10 mmol/L),按生物素:蛋白(摩尔比)为 20:1 的比例,加入 DnaJ 蛋白及生物素溶液,PBS 定容至 1 ml,颠倒混匀后,4 ℃静置 1 h 进行生物素标记。采用脱盐柱纯化生物素标记 DnaJ 蛋白,4 ℃保存备用(纯化后生物素标记 DnaJ 蛋白浓度为 10~15 μg/ml)。用 PBS 将 Eno 蛋白稀释成 2、4、6、8 μmol/L,上样 200 μl,利用 ForteBio Octet RED96 大分子反应分析仪检测。以 PBS 为空白对照。

1.3 统计分析

数据统计分析和作图采用 Graph Pad Prism 5.01 和 SPSS 19.0 软件。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。2 组数据间差异性比较采用 *t'* 检验,多组数据间差异性比较采用单因素方差分析,总体差异有统计学意义情况下再采用 Dunnett *t* 检验进行组间两两比较,趋势性分析采用 Spearman 秩相关分析。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 重组 Eno 蛋白的表达及纯化

2.1.1 重组质粒 pET28a-eno 的构建与鉴定 PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,在 1 305 bp 位置可见 eno 全长条带(图 1A)。将此片段插入表达质粒 pET28a 中,重组质粒转化 *E.coli* BL21,挑取阳性克隆进行 PCR 鉴定,扩增到 1 305 bp 的目的条带(图 1B)。提取质粒进行酶切鉴定,也得到相同大小的条带(图 1C)。质粒送华大基因测序,结果与 GenBank 公布的测序结果一致,证明重组质粒构建成功。

2.1.2 重组 Eno 蛋白的诱导表达及纯化 SDS-PAGE 凝胶电泳显示,与未诱导的重组菌相比,重组菌 *E.coli* BL21-pET28a-eno 经 0.05 mmol/L 的 IPTG 诱导后,在分子量约为 47 kD 处可见明显增粗的蛋白条带(图 2)。超声破碎细菌后

上清经 Ni-NTA 树脂亲和层析纯化,超滤脱盐后 SDS-PAGE 凝胶电泳分析,发现所得重组 Eno 蛋白纯度达 90%(图 2),可用于后续实验。

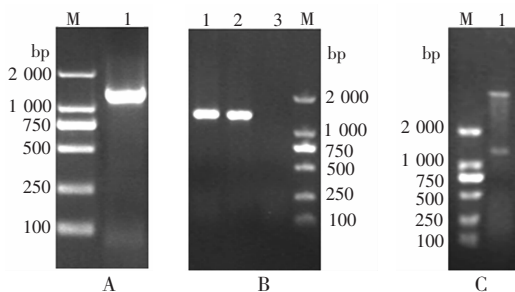


图 1 重组质粒 pET28a-eno 构建与鉴定
Fig.1 Construction and identification of recombinant plasmid pET28a-eno

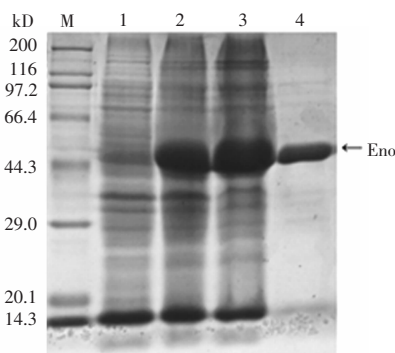


图 2 重组 Eno 蛋白诱导表达及纯度分析
Fig.2 Expression and purity analysis of recombinant Eno by SDS-PAGE

2.1.3 重组 Eno 蛋白酶活性测定 为鉴定所制备的重组 Eno 蛋白是否具有生物学活性,本研究对该蛋白的酶活性进行了测定。与阳性对照酵母 Eno 蛋白相比,重组 Eno 蛋白也具有酶活性且其活性高于阳性对照(图 3)。

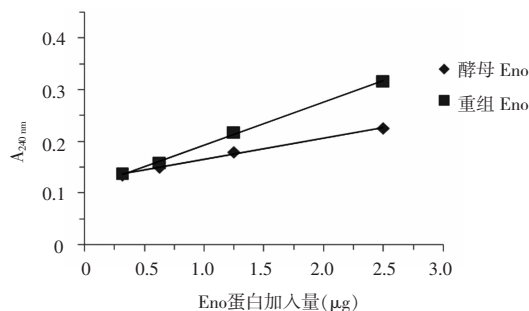


图 3 重组 Eno 蛋白酶活性测定
Fig.3 α-Enolase activity of purified recombinant Eno

2.2 Eno 蛋白分泌保守性分析

重组 Eno 免疫昆明小鼠 3 次后,分离血清,经间接 ELISA 法测定效价,获得效价达 $1:7.68 \times 10^6$ 的抗 Eno 多克隆抗体。利用此抗体分析 Eno 蛋白的分泌保守性,在肺炎链球菌常见的 7 种血清型中,均能在培养上清中检测到分子量约 47 kD 的特异性反应带(图 4),证实 Eno 蛋白在肺炎链球菌中的表达和分泌是保守存在的。

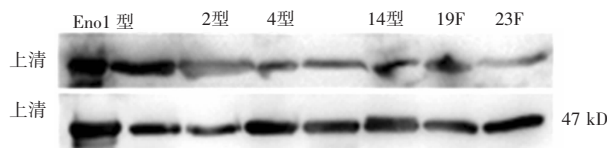


图 4 Eno 蛋白分泌保守性分析
Fig.4 Expression of Eno in various *S.pneumoniae* strains

2.3 直接结合实验验证 Eno 和 DnaJ 的结合

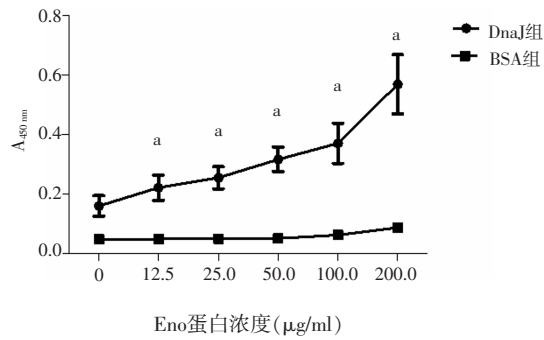
在不同浓度 Eno 蛋白加入的情况下,与 BSA 对照组相比,Eno 蛋白与 DnaJ 蛋白组结合的 A 值具有统计学差异($t=3.115, P=0.026; t=3.582, P=0.014; t=3.829, P=0.012; t=4.013, P=0.010; t=5.485, P=0.003$)。根据直接结合实验原理,A 值大小反映了所结合的 Eno 蛋白量的多少,提示 DnaJ 组结合的 Eno 蛋白量与对照组相比具有统计学差异;通过 Spearman 秩相关分析,Eno 蛋白与 DnaJ 蛋白组结合的吸光度值与 Eno 蛋白浓度正相关($r=0.920, P=0.000$),提示随着 Eno 蛋白浓度增加,DnaJ 蛋白组结合的 Eno 蛋白量也随之增加,其 A 值从 0.222 ± 0.042 (12.5 $\mu\text{g/ml}$) 增加到 0.569 ± 0.099 (200.0 $\mu\text{g/ml}$)。以上结果说明 Eno 可直接结合 DnaJ,且呈浓度梯度依赖的关系(表 2、图 5)。

表 2 不同浓度 Eno 蛋白与 DnaJ、BSA 蛋白结合的吸光度值比较 ($\bar{x} \pm s$,各浓度 Eno 蛋白样本数为 6,各组样本 $n=36$)

Tab.2 Comparison of normalized absorbance values at 450 nm of Eno binding to DnaJ or BSA ($\bar{x} \pm s, n=36$)

分组	0 $\mu\text{g/ml}$	12.5 $\mu\text{g/ml}$	25.0 $\mu\text{g/ml}$	50.0 $\mu\text{g/ml}$	100.0 $\mu\text{g/ml}$	200.0 $\mu\text{g/ml}$
DnaJ组	0.161 ± 0.034	0.222 ± 0.042^a	0.256 ± 0.037^a	0.317 ± 0.041^a	0.371 ± 0.068^a	0.569 ± 0.099^a
BSA组	0.050 ± 0.002	0.051 ± 0.003	0.051 ± 0.002	0.052 ± 0.004	0.064 ± 0.002	0.088 ± 0.002
t 值	—	3.115	3.582	3.829	4.013	5.485
P 值	—	0.026	0.014	0.012	0.010	0.003

注:a,与 BSA 对照组相比, $P<0.05$;—,未比较



a, 与 BSA 对照组相比, $P < 0.05$

图 5 不同浓度 Eno 蛋白与 DnaJ、BSA 蛋白结合的吸光度值变化
($\bar{x} \pm s, n=36$)

Fig.5 Absorbance values at 450 nm of Eno binding to DnaJ or BSA analyzed by direct binding assay ($\bar{x} \pm s, n=36$)

2.4 BLI 技术验证 Eno 和 DnaJ 的结合

为进一步验证 Eno 可以直接结合 DnaJ, 本研究利用 BLI 技术对两者的结合进行了分析。实验结果显示, 随着 Eno 蛋白浓度的增加, Eno 与 DnaJ 的结合量亦增加, 与直接结合实验结果一致(图 6)。通过软件计算, 结合的亲和常数为 $9.26 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ (表 3)。再次说明 Eno 和 DnaJ 可以直接结合, 且具有较强的特异性。

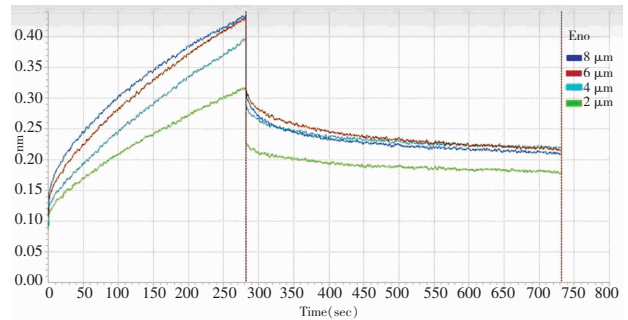


图 6 BLI 验证 Eno 和 DnaJ 的结合

Fig.6 Eno binding to DnaJ analyzed by BLI

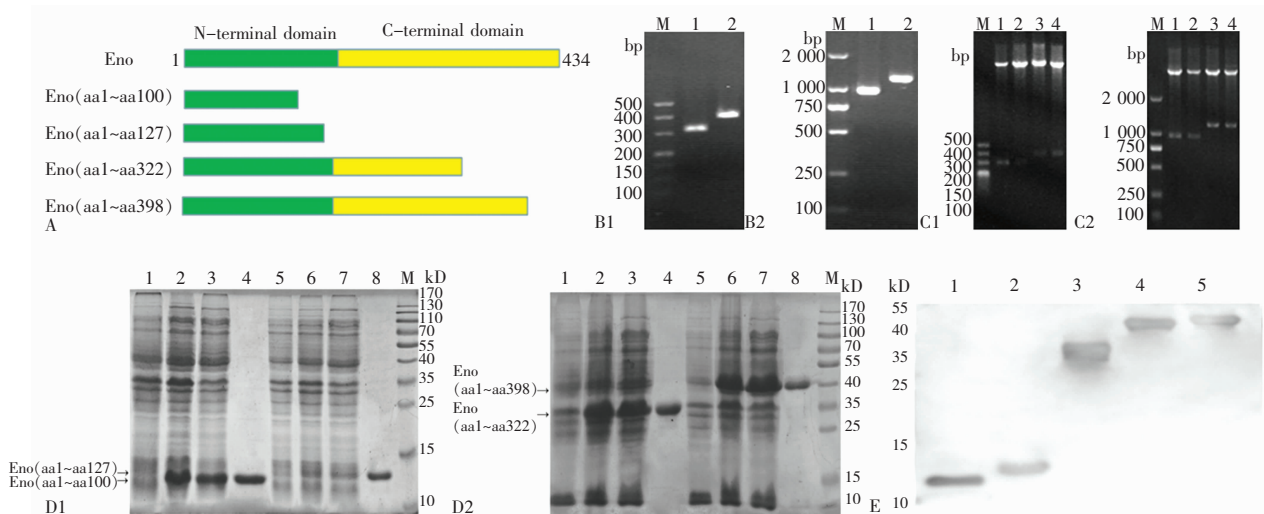
表 3 BLI 验证 Eno 和 DnaJ 相互作用相关参数

Tab.3 Affinity and rate constants for interactions between Eno and DnaJ obtained using BLI analysis

相互作用 蛋白	亲和常数 (mol/L)	结合常数[L/ (mol·s)]	解离常数 (1/s)	相关 系数
DnaJ-Eno	9.26×10^{-7}	5.22×10^2	4.83×10^{-4}	0.989

2.5 Eno 与 DnaJ 的结合位点分析

在证实了 Eno 确实与 DnaJ 存在结合后, 本研究对 Eno 蛋白上的结合位点进行了分析。首先, 根据 Eno 蛋白的 2 级结构, 设计了 4 段截短表达的 Eno 蛋白(图 7A), 经过 PCR 扩增相应的目的片段(图 7B), 酶切后连接载体 pCold II, 并



A. 截短 Eno 蛋白示意图; B. PCR 扩增 eno1~4 片段; B1. M. DL500 DNA marker; 1. eno1(303 bp); 2. eno2(384 bp); B2. M. DL2 000 DNA marker; 1. eno3(969 bp); 2. eno4(1 197 bp); C. 重组质粒 pCold II-eno1~4 双酶切鉴定; C1. M. DL500 DNA marker; 1~4. pCold II-eno1~2 NdeI 和 HindIII 双酶切产物; C2. M. DL2 000 DNA marker; 1~4. pCold II-eno3~4 NdeI 和 HindIII 双酶切产物; D. 重组截短 Eno 诱导表达及纯度分析 SDS-PAGE 凝胶电泳图; D1. 1~3. BL21-pCold II-eno1 未诱导、诱导后全菌、诱导后破菌上清; 4. 纯化的重组截短 Eno(aa1~aa100) 蛋白; 5~7. BL21-pCold II-eno2 未诱导、诱导后全菌、诱导后破菌上清; 8. 纯化的重组截短 Eno(aa1~aa127) 蛋白; M. 预染蛋白 Marker; D2. 1~3. BL21-pCold II-eno3 未诱导、诱导后全菌、诱导后破菌上清; 4. 纯化的重组截短 Eno(aa1~aa322) 蛋白; 5~7. BL21-pCold II-eno4 未诱导、诱导后全菌、诱导后破菌上清; 8. 纯化的重组截短 Eno(aa1~aa398) 蛋白; M. 预染蛋白 Marker; E. 重组截短 Eno 蛋白 Western blot 鉴定图; 1~5. 重组 Eno(aa1~aa100)、Eno(aa1~aa127)、Eno(aa1~aa322)、Eno(aa1~aa397)、Eno 蛋白

图 7 截短 Eno 蛋白表达、纯化与鉴定

Fig.7 Expression, purification and identification of recombinant truncated Eno

转化 *E.coli* BL21 感受态。提取质粒经双酶切鉴定(图 7C)及测序验证后,证实重组质粒构建成功。分别进行诱导表达并纯化,获得了上述 4 段截短表达的 Eno 蛋白,纯度均大于 90% (图 7D)。Western blot 结果显示,抗 Eno 的多克隆抗体均可识别这 4 段截短蛋白(图 7E),可用于后续实验。

直接结合实验结果显示,4 段截短 Eno 蛋白均与 DnaJ 蛋白存在结合,但各组截短蛋白与 DnaJ 蛋白结合的吸光度值存在统计学差异($F=24.06, P=0.000$),并且截短蛋白 Eno(aa1~aa100)与 DnaJ 蛋白结合的吸光度值与其余 3 组截短蛋白相比均存在统计学差异($P=0.000, P=0.001, P=0.000$),提示截短蛋白 Eno(aa1~aa100)与 DnaJ 结合量与其余 3 组截短蛋白相比均存在统计学差异。以上结果表明截短蛋白 Eno(aa1~aa100)结合能力最强,提示结合位点主要位于该区段内(图 8、表 4)。

表 4 4 组截短 Eno 蛋白与 DnaJ 蛋白结合的吸光度值比较
($\bar{x} \pm s$)

Tab.4 Comparison of absorbance values at 450 nm of truncated Eno binding to DnaJ in four groups ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数 (n)	吸光度值 ($A_{450\text{nm}}$)	F 值	P 值	P 值 ^a
Eno(aa1~aa100)组	3	2.25 $\pm$ 0.38			
Eno(aa1~aa127)组	3	0.94 $\pm$ 0.25 ^a	24.06	0.000	0.000
Eno(aa1~aa322)组	3	1.08 $\pm$ 0.09 ^a			0.001
Eno(aa1~aa398)组	3	0.75 $\pm$ 0.12 ^a			0.000

注:a,与 Eno(aa1~aa100)组比较, $P<0.05$

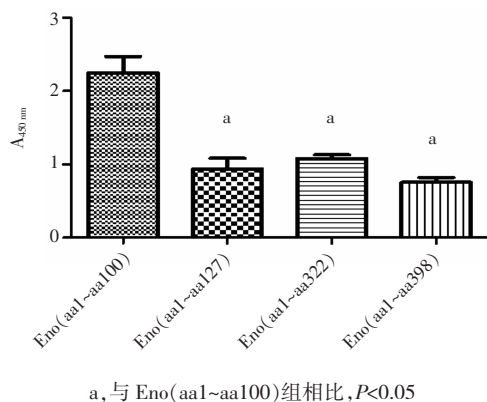


图 8 4 组截短 Eno 蛋白与 DnaJ 蛋白结合的吸光度值比较
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.8 Comparison of absorbance values at 450 nm of truncated Eno binding to DnaJ in four groups analyzed by direct binding assay ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

肺炎链球菌是一种常见的条件致病菌,可以引起肺炎,脑膜炎,中耳炎和菌血症,严重时可危及患

者的生命^[13]。肺炎链球菌通过表达一系列的毒力因子,促进其在宿主体内定植与扩散。这些毒力因子大多与其发病机制相关,如荚膜多糖、肺炎球菌溶血素以及肺炎球菌表面蛋白 C 等。因此,从毒力因子入手,明确其参与致病的机制,对肺炎链球菌感染的预防和治疗都有重要意义。

作为一种必需基因,eno 在细菌中应保守表达,而作为一种多功能蛋白,Eno 需要通过分布于细菌表面和胞外分泌发挥作用^[14]。因此,本研究首先对该蛋白在肺炎链球菌中的表达及分泌的保守性进行了验证。实验结果显示,在不同的肺炎链球菌菌株中,Eno 不仅在胞内保守性的表达,其胞外分泌也是保守存在的,提示该蛋白的多功能作用普遍存在于各血清型肺炎链球菌。

课题组前期研究显示,DnaJ 蛋白与 Eno 蛋白存在相互作用,并能调节 Eno 蛋白的表达水平。那么,这种调控是否是直接作用呢?双杂交技术可鉴定蛋白之间存在相互作用,但不能提示其是否为直接作用。直接结合实验、Pull-down 技术由于操作简便,常用于直接相互作用的验证工作。BLI、表面等离子共振可实时监测蛋白之间的相互作用,同时可测定蛋白质之间相互作用的动力学参数。因此,本研究首先采用直接结合实验验证了 DnaJ 蛋白与 Eno 蛋白是直接相互作用,再通过 BLI 技术进一步确证这种结合,并测定出其亲和常数为 0.926 $\mu\text{mol/L}$ 。该结果提示 DnaJ 与 Eno 结合具有较强的亲和力,并且与 Eno-纤溶酶原这一受体-配体结合的亲和常数相比(约 1.02 $\mu\text{mol/L}$)^[7],其亲和力略强。

确证 Eno 可直接结合 DnaJ 后,本研究对其结合位点进行了分析。已有大量文献证实,DnaJ 蛋白与蛋白底物的结合位点为其 C 末端结构域^[15],因此,本研究主要分析了 Eno 蛋白上的 DnaJ 蛋白的结合位点。通过截短表达 Eno 蛋白的直接结合实验显示,4 种截短的 Eno 蛋白都与 DnaJ 蛋白有结合,但其 N 末端结构域的前 100 个氨基酸序列的结合能力较其他截短蛋白显著增高,结合 DnaJ 的量可达其他蛋白的 2 倍以上,提示 Eno 蛋白的 aa1~aa100 片段为其与 DnaJ 的主要结合位点。此外,由于加入的每种截短蛋白的质量均一致,故 Eno(aa1~aa322)和 Eno(aa1~aa398)蛋白的摩尔数为 Eno(aa1~aa100)的 1/3~1/4,检测结果显示前两者与 DnaJ 的结合量约为后者的 1/2,这也提示 Eno 上可能存在多个

DnaJ 的结合位点。

Kota 等^[16]利用生物信息学,对 *E.coli* 中 DnaJ 蛋白结合底物时所识别的模序进行分析,发现了 1 个特异性模序 GX[LMQ]{P}X{P}{CIMPVW}, 其中 [LMQ] 表示为 L、M、Q 3 种氨基酸中任意 1 种, {P} 表示除 P 的任意 1 种氨基酸。本研究对 Eno 蛋白序列进行比对分析后发现,其 N 端片段 aa1~aa100 内确有 1 个符合上述描述的模序 GGLGTQK。同时,本研究发现 C 端片段 aa331~aa354 内也存在类似模序 GIQEGAA、GTLTETF。本研究结果显示 aa1~aa100 片段和含 aa331~aa354 的片段都能与 DnaJ 结合,这与该文献的预测一致。但结果显示前者的结合能力显著高于后者,其原因可能如下:这些模序中氨基酸并不完全相同,有差异的氨基酸可导致其表面电荷、疏水性等化学性质的变化,从而影响相应片段与 DnaJ 蛋白的亲和力;本研究采用的含 aa331~aa354 的蛋白片段较长,其结合模序可能被部分包裹于多肽内部,因而没有发挥最大结合效力。

综上所述,本研究证实了 Eno 蛋白在肺炎链球菌中的保守表达和胞外分泌的保守性,并证实了 Eno 可直接结合热休克蛋白 DnaJ,其结合位点主要位于 N 末端结构域 1~100 个氨基酸序列,为进一步研究热休克蛋白对蛋白水平调控的作用机制奠定了实验基础,也为研究肺炎链球菌毒力表达提供了一定的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Mayer MP, Bukau B. Hsp 70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(6): 670–684.
- [2] Champ S, Puvirajesinghe TM, Perrody E, et al. Chaperone-assisted exciseive recombination, a solitary role for DnaJ (Hsp 40) chaperone in lysogeny escape[J]. *J Bio Chem*, 2011, 286(45): 38876–38885.
- [3] Yamaguchi Y, Tomoyasu T, Takaya A, et al. Effects of disruption of heat shock genes on susceptibility of *Escherichia coli* to fluoroquinolones[J]. *BMC Microbiol*, 2003, 3(1): 1–8.
- [4] Takaya A, Tomoyasu T, Matsui H, et al. The DnaK/DnaJ chaperone machinery of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is essential for invasion of epithelial cells and survival within macrophages, leading to systemic infection[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(3): 1364–1373.
- [5] 崔 瑾, 张 群, 董 杰, 等. 肺炎链球菌 dnaJ 基因缺陷菌株的构建及毒力变化的初步研究[J]. *第三军医大学学报*, 2011(19): 2000–2003.
- [6] Cai Y, Yan W, Xu W, et al. Screening and Identification of DnaJ Interaction Proteins in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Current microbiology*, 2013, 67(6): 732–741.
- [7] Berqmann S, Rohde M, Chhatwal GS, et al. α -Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface[J]. *Mol Microbiol*, 2001, 40(6): 1273–1287.
- [8] Agarwa V, Hammerschmidt S, Malm S, et al. Enolase of *Streptococcus pneumoniae* binds human complement inhibitor c4b-binding protein and contributes to complement evasion[J]. *J Immunol*, 2012, 189(7): 3575–3584.
- [9] Mori Y, Yamaguchi M, Terao Y, et al. α -Enolase of *Streptococcus pneumoniae* induces formation of neutrophil extracellular traps[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(13): 10472–10481.
- [10] Guidolin A, Morona JK, Morona R, et al. Nucleotide sequence analysis of genes essential for capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 19 F[J]. *Infect Immun*, 1994, 62(12): 5384–5396.
- [11] 张 帅, 刘宇思, 王 虹, 等. 肺炎链球菌组氨酸激酶 VicK 的全长表达及其保守性分析[J]. *中国抗生素杂志*, 2014, 39(2): 131–136.
- [12] 王 哲, 王建敏, 马 峰, 等. 肺炎链球菌 SpxB 的细胞表达定位、保守性分析及其生物学功能初探[J]. *第三军医大学学报*, 2014, 36(14): 1486–1491.
- [13] Agarwal S, Agarwal S, Pancholi P, et al. Strain-specific regulatory role of eukaryote-like serine / threonine phosphatase in pneumococcal adherence[J]. *Infect Immun*, 2012, 80(4): 1361–1372.
- [14] Henderson B, Martin A. Bacterial moonlighting proteins and bacterial virulence[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013, 358(21): 155–213.
- [15] Cuéllar J, Perales-Calvo J, Muga A, et al. Structural insights into the chaperone activity of the 40-kDa heat shock protein DnaJ: binding and remodeling of a native substrate[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(21): 15065–15074.
- [16] Kota P, Summers DW, Ren HY, et al. Identification of a consensus motif in substrates bound by a Type I Hsp40[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(27): 11073–11078.

(责任编辑: 关蕴良)