

DOI:10.13350/j.cjpb.231102

• 论著 •

A、B、C群链球菌DnaK蛋白的原核表达及生物信息学分析^{*}

鲍光彬,姜雅倩,姚卫平,卢奇,王晴^{**}

(安徽农业大学 动物科技学院,安徽合肥 230036)

【摘要】 目的 分别对来自兰氏分群 A、B、C 群链球菌的 DnaK 蛋白进行原核表达和纯化,并进行生物信息学分析。

方法 根据 DnaK 基因序列设计特异性引物,以 A 群链球菌化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 菌株 CVCC593、B 群链球菌无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 菌株 S001 和 C 群链球菌马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus equi* subspecies *equi*) 菌株 ATCC35246 基因组为模板进行 PCR 扩增,用限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 双酶切 pET-28a 质粒和扩增得到的 DnaK 基因片段后连接,分别构建带 His 标签的重组质粒。经测序验证后,将重组质粒转化入大肠埃希菌 BL21 (DE3) 感受态细胞,用 IPTG 诱导表达重组蛋白并纯化,采用 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 进行分析验证。利用生物信息学工具对 DnaK 蛋白进行分析和预测。结果 成功原核表达和纯化了 3 株不同兰氏分群链球菌的 DnaK 重组蛋白,分子质量约为 70 ku。蛋白呈可溶性表达,经镍柱纯化后得到单一电泳条带的目的蛋白。Western blot 检测该重组蛋白能被 His 标签抗体和 R 群链球菌猪链球菌 (*Streptococcus suis*) DnaK 蛋白的兔多克隆抗体识别。生物信息学分析 A、B、C 群的 DnaK 蛋白与 R 群 DnaK 蛋白之间同源性在 90% 以上;亚细胞定位分析显示 DnaK 蛋白主要存在于细胞质中;DnaK 蛋白二级结构由 α -螺旋、延伸链、 β -转角和无规则卷曲组成,以由 α -螺旋占比较高,均在 40% 以上;蛋白互作网络分析表明,链球菌 DnaK 可能与 DnaJ、GrpE、HrcA 等蛋白发生互作。结论 原核表达并纯化了 A、B、C 群链球菌的 DnaK 蛋白,生物信息学分析显示 A、B、C 群链球菌 DnaK 蛋白与 R 群 DnaK 蛋白的同源性高,且主要存在于细胞质中,为进一步研究链球菌 DnaK 蛋白的功能及其在致病机制中的作用奠定了基础。

【关键词】 链球菌;DnaK 蛋白;原核表达;生物信息学分析

【中图分类号】 R378.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)11-1245-07

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Nov.;18(11):1245-1251.]

Prokaryotic expression and bioinformatics analysis of the DnaK protein from Group A, B and C *Streptococcus*

BAO Guangbin, JIANG Yaqian, YAO Weiping, LU Qi, WANG Qing (College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)^{**}

【Abstract】 **Objective** To prokaryotic express and purify of the DnaK protein from Group A, B and C *Streptococcus*, and bioinformatics analysis was conducted. **Methods** Specific primers were designed according to the DnaK gene sequence, the genome of *Streptococcus pyogenes* (Group A *Streptococcus*) strain CVCC593, *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*) strain S001, and *Streptococcus equi* subspecies *equi* (Group C *Streptococcus*) strain ATCC35246 were used as templates, and PCR amplification was performed. Recombinant plasmids with His tags were constructed using restriction endonucleases BamH I and Xho I to cleave the pET-28a plasmid and the amplified *DnaK* fragments. After sequencing identification, the recombinant plasmids were transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) competent cells. The recombinant protein was induced and expressed with IPTG, then was purified before SDS-PAGE electrophoresis analysis and Western blot identification. Bioinformatics tools were used to analyze and predict the DnaK protein. **Results** DnaK recombinant protein from Group A, B and C *Streptococcus* was prokaryotic expressed and purified successfully, the protein size is approximately 70 ku. The recombinant protein is soluble expressed. After purification with Ni²⁺ nickel column, a single target protein band was obtained. Western blot results showed that the recombinant protein can be recognized by His-tag antibody and *Streptococcus suis* (Group R *Streptococcus*) DnaK rabbit polyclonal antibody. According to the bioinformatics analysis, the homology of DnaK protein from Group A, B, C and R *Streptococcus* is over 90%; subcellular localization analysis of DnaK showed that it mainly exists in the cytoplasm; the secondary structure of DnaK consists of

* 【基金项目】 安徽农业大学神农学者培育计划(No. rc392101);安徽农业大学引进和稳定人才科研基金项目(No. rc392012)。

** 【通讯作者】 王 晴, E-mail: qingwang@ahau.edu.cn

【作者简介】 鲍光彬(2001-),男,安徽铜陵人,硕士研究生。主要研究方向:动物病原学。E-mail: 1179429842@qq.com

α -helix, extended strand, β -turn and random coil, the proportion of α -helix is highest in DnaK protein (over 40%). Protein-protein interaction network analysis indicated that *Streptococcus* DnaK may interact with proteins such as Dnaj, GrpE, HrcA, etc. **Conclusion** This study obtained purified DnaK recombinant protein from Group A, B, and C *Streptococcus*. Bioinformatics analysis results indicated that the homology of DnaK protein from Group A, B, C and R *Streptococcus* is high, which mainly exists in cytoplasm. This study laid a foundation for further studying the function of DnaK in *Streptococcus* and its role in bacterial pathogenesis.

【Key words】 *Streptococcus*; DnaK; prokaryotic expression; bioinformatics analysis

细菌分子伴侣 DnaK 蛋白与热休克蛋白 HSP70 同源, 参与蛋白质的折叠、组装, 修复错误折叠的蛋白质, 并且对于细菌在应激条件下(如高温、抗生素)的存活至关重要^[1-2]。在细菌感染过程中, DnaK 与细菌毒力和致病性相关^[3]。据报道, 幽门螺杆菌 DnaK 与细菌对宿主细胞的黏附有关^[4]。在中间链球菌, 缺失 DnaK 基因会降低细菌对人肝癌细胞 HepG2 的毒性^[5]。布鲁菌的 DnaK 可抑制巨噬细胞凋亡, 促进细菌的胞内增殖^[6]。

链球菌是一种革兰阳性球菌, 归属于乳杆菌目、链球菌科。目前已发现一百多种链球菌。根据 20 世纪 30 年代 Rebecca Lancefield 提出的基于细胞壁相关碳水化合物抗原反应的链球菌分类方法, 可将链球菌分为 A-W 群, 其中对人和动物致病的主要有 A、B、C、R 群等^[7]。A 群链球菌只有化脓性链球菌一种, 定植于咽喉或皮肤表面, 引起咽炎、皮炎以及全身性感染^[8]。B 群链球菌以无乳链球菌为代表, 能感染人类、牛和鱼, 引起孕妇流产和新生儿败血症、脑膜炎, 奶牛乳腺炎也与该菌感染有关^[9]。与人和动物疾病相关的 C 群链球菌主要包括停乳链球菌停乳亚种、马链球菌兽疫亚种、马链球菌马亚种等, 引起心内膜炎、肺炎和人链球菌中毒性休克综合征等疾病^[10]。与动物和人类疾病相关的 R 群链球菌主要是猪链球菌, 引起猪的败血症、脑膜炎、肺炎、心内膜炎和关节炎, 人感染该菌可引起链球菌中毒性休克综合征^[11]。

近期研究报道, 猪链球菌 DnaK 蛋白与细菌抗巨噬细胞的吞噬作用相关^[12], 但具体机制尚不明确。对 A、B、C、R 群链球菌 DnaK 蛋白进行同源性比对, 发现 DnaK 蛋白氨基酸序列高度保守, 推测其在链球菌中可能有相似的生物学功能。本实验原核表达、纯化 3 株分别来自 A、B、C 群链球菌的 DnaK 蛋白, 并进行生物信息学分析, 为进一步研究 DnaK 蛋白在链球菌致病机中的作用奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株与质粒 化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 菌株 CVCC593、无乳链球菌 (*S. agalactiae*) 菌株 S001、马链球菌兽疫亚种 (*S. equi* subspecies

equi), 菌株 ATCC35246 由南京农业大学兽医微生物学与免疫学实验室提供; 原核表达质粒 pET-28a 由本实验室保存; *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞购自南京擎科生物科技有限公司。

1.2 主要试剂 细菌基因组 DNA 提取试剂盒和质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; 胶回收试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司; 限制性内切酶 BamH I 和 Xho I, 10×Q Buffer 及 Solution I 购自日本 Takara 公司; 预染蛋白分子质量标准购自美国 UE 生物公司; 2×phanta Max Mix 和高敏型 ECL 化学发光荧光检测试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司; PAGE 凝胶快速制备试剂盒(10%)购自上海雅伦生物科技有限公司; 卡那霉素购自生工生物工程(上海)有限公司; Ni-IDA Agarose 6FF 购自博迈德生物科技有限公司; 鼠抗 His 标签抗体, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 和羊抗兔 IgG 购自索莱宝科技有限公司; IPTG 购自北京孚博生物科技有限公司。

2 方法

2.1 引物的设计与合成 根据 NCBI 公布的 *S. pyogenes* (GenBank: WP_002993774.1)、*S. agalactiae* (GenBank: U72719.1)、*S. equi* (GenBank: AEJ24622.1) DnaK 基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 扩增引物, 引物信息见表 1(加粗为保护性碱基, 下划线部分为 BamH I 和 Xho I 酶切位点)。引物由南京擎科生物有限公司合成。

表 1 PCR 扩增引物
Table 1 PCR amplification primers

引物名称 Primers	引物序列(5'-3') Primer sequence
HLLQ-F	CGCGGATCC ATGTCTAAATTATTGGTATTGAC
HLLQ-R	CCG <u>CTCGAG</u> CTTTCTGTAAATTGCCATC
WRLQ-F	CG <u>GGGATCC</u> ATGTCTAAATTATTGGTATTGAC
WRLQ-R	CCG <u>CTCGAG</u> TTCTCAGTGAATTGCCAT
MLQ-F	CG <u>GGGATCC</u> ATGTCTAAATTATCGGTATTGAC
MLQ-R	CCG <u>CTCGAG</u> TTTCAGTGAACTCACCAT

2.2 DnaK 基因片段的扩增 分别取 *S. pyogenes* 菌株 CVCC593、*S. agalactiae* 菌株 S001 及 *S. equi* 菌株 ATCC35246 用液体 THB 培养基于 37 °C、180

r/min 震荡培养至 A_{600} 值达 1.0。收集菌体,按照细菌基因组提取试剂盒说明书分别提取 3 株链球菌的基因组 DNA。分别以提取的 3 株链球菌的基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 DnaK 基因,扩增产物作 1% 琼脂糖凝胶电泳分析并胶回收。

2.3 DnaK 蛋白表达菌株的构建及鉴定 用限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 将 DnaK 基因扩增产物和表达质粒 pET-28a 进行双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳回收酶切产物。将胶回收的目的片段和双酶切后的空载体质粒进行连接,连接体系总计 10 μ L(solution I 5 μ L, 目的基因 4 μ L, 线性化载体 1 μ L),于 16 ℃ 反应 30 min, 构建重组质粒 PET-28a-HL-DnaK、PET-28a-WR-DnaK、PET-28a-ML-DnaK。将上述重组质粒分别转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,37 ℃、180 r/min 震荡培养 1 h 后离心。取菌体,涂布至含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 琼脂平板上,于 37 ℃ 温箱中过夜培养。次日,挑取单菌落进行 PCR 鉴定,将阳性克隆送至南京擎科生物科技有限公司测序。

提取上述测序正确的重组质粒,分别转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中,震荡培养后涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 琼脂平板,37 ℃ 过夜培养。挑取单菌落至 50 μ g/mL 含卡那霉素的 LB 液体培养基,震荡培养 12 h, 提取质粒,经双酶切后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2.4 DnaK 蛋白的表达与纯化 将上述含有重组质粒的大肠埃希菌杆菌 BL21 分别按照 1 : 100 的比例接种至含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基,37 ℃、180 r/min 震荡培养。待菌液 A_{600} 值达到 0.6 时,加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG,16 ℃、180 r/min 连续诱导 16 h。4 ℃ 离心收集菌体,用 PBS 洗涤 3 次,重悬菌体,冰浴条件下超声破碎,4 ℃、12 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 10 min,收集上清和沉淀,加入 5×SDS-PAGE 上样缓冲液分别制备蛋白样品,通过 SDS-PAGE 分析上清和沉淀中 DnaK 重组蛋白的含量,判定蛋白可溶性。取可溶性蛋白进行纯化,将超声破碎后上清液用 0.45 μ m 的滤膜过滤,滤液利用 Ni-IDA Agarose 6FF 亲和层析柱进行纯化,按照说明书操作。纯化产物采用 SDS-PAGE 检测蛋白的纯度。

2.5 重组蛋白 DnaK 的 Western blot 鉴定 纯化的 DnaK 蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶 37 ℃ 封闭 2 h。然后分别以鼠抗 His 标签抗体(1 : 4 000 稀释)和兔抗猪链球菌 DnaK 蛋白多克隆抗体(1 : 1 000 稀释)为一抗,以 1 : 4 000 稀释的 HRP-羊抗小鼠 IgG、HRP-羊抗兔 IgG 为二抗进行 Western blot。用诺唯赞生物科技公司的高敏型 ECL 化学发光检测试剂盒进行显色曝光。

2.6 生物信息学分析 根据 NCBI 中 *S. suis* DnaK 基因序列(GenBank:WP_012775492.1)和本研究中的测序结果进行生物信息学分析:利用 ESPript 3.0(<https://escript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>)进行 DnaK 氨基酸序列比对;利用 SignalP-4.1(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)进行信号肽分析;运用 PSORT II Prediction(<https://psort.hgc.jp/form2.html>)预测 DnaK 蛋白的亚细胞定位;运用 SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa-dsc.html)和 SWISS MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)预测 DnaK 蛋白的二、三级结构;利用 STRING(<https://string.embl.de>)进行蛋白质互作网络分析。

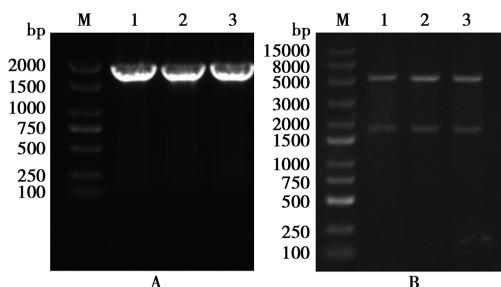
结 果

1 DnaK 原核表达载体的构建与鉴定

分别以 *S. pyogenes* 菌株 CVCC593、*S. agalactiae* 菌株 S001 和 *S. equi* 菌株 ATCC35246 基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 DnaK 基因,扩增片段大小与预期一致(约 1 830 bp)(图 1A)。扩增片段经限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 双酶切后分别连接至 pET-28a 质粒,获得 pET-28a-HL-DnaK、pET-28a-WR-DnaK、pET-28a-ML-DnaK 重组质粒,转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。测序鉴定正确后将重组质粒转化入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,获得 3 株原核表达工程菌株 28a-HL-DnaK/BL21、28a-WR-DnaK/BL21、28a-ML-DnaK/BL21。对构建的重组质粒进行双酶切鉴定,均得到大小约为 5 320 bp 和 1 830 bp 的两条酶切片段(图 1B),与理论值相符,重组质粒构建正确。

2 DnaK 蛋白的诱导表达与可溶性分析

将构建的含有重组质粒的原核表达工程菌株 28a-HL-DnaK/BL21、28a-WR-DnaK/BL21、28a-ML-DnaK/BL21 培养于含有卡那霉素的 LB 液体培养基至对数期,加入 IPTG 诱导培养,经 SDS-PAGE 电泳检测表达情况。结果显示,诱导后得到与预期蛋白分子质量大小一致的表达蛋白(约 70 ku)(图 2A)。取诱导后的菌体,PBS 重悬后超声破碎,离心,取上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳。结果显示,在上清中均含有与预期分子质量一致的目的蛋白,而沉淀中目的蛋白的量较少(图 2B),表明 DnaK 重组蛋白主要在上清中表达。

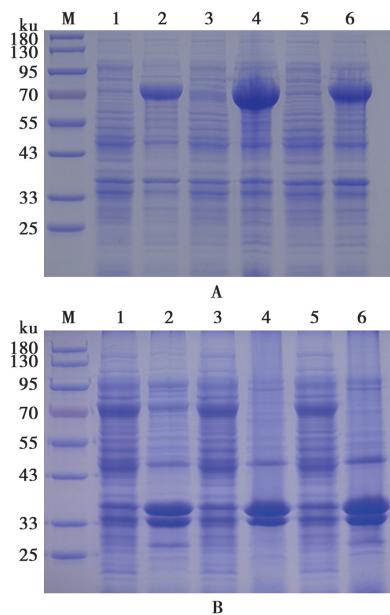


A DnaK 基因 PCR 扩增产物 M DNA 标志物(DL 2000) 1~3 分别为 *S. pyogenes* CVCC593 株、*S. agalactiae* S001 株和 *S. equi* ATCC35246 株 DnaK 基因扩增产物 B 重组质粒双酶切鉴定 M DNA 标志物(DL 15000) 1~3 分别为 pET-28a-HL-DnaK, pET-28a-WR-DnaK, pET-28a-ML-DnaK 双酶切产物

图 1 DnaK 基因扩增及重组质粒双酶切鉴定

A PCR products of *DnaK* gene M DNA marker (DL 2000) 1~3 PCR products of *DnaK* gene from *S. pyogenes* CVCC593, *S. agalactiae* S001 and *S. equi* ATCC35246 B Double digestion identification of recombinant plasmid M DNA marker (DL 15000) 1~3 Digestion products of pET-28a-HL-DnaK, pET-28a-WR-DnaK and pET-28a-ML-DnaK

Fig. 1 *DnaK* gene amplification and double digestion identification of recombinant plasmid



A 重组蛋白 DnaK 的表达鉴定 M 蛋白分子质量标准 1、3、5 分别为未诱导的 28a-HL-DnaK/BL21, 28a-WR-DnaK/BL21, 28a-ML-DnaK/BL21 对照 2、4、6 分别为 IPTG 诱导的 28a-HL-DnaK/BL21, 28a-WR-DnaK/BL21, 28a-ML-DnaK/BL21 表达产物 B 重组蛋白 DnaK 的可溶性分析 M 蛋白分子质量标准 1、3、5 分别为 IPTG 诱导的 28a-HL-DnaK/BL21, 28a-WR-DnaK/BL21, 28a-ML-DnaK/BL21 裂解上清 2、4、6 分别为 IPTG 诱导的 28a-HL-DnaK/BL21, 28a-WR-DnaK/BL21, 28a-ML-DnaK/BL21 裂解沉淀

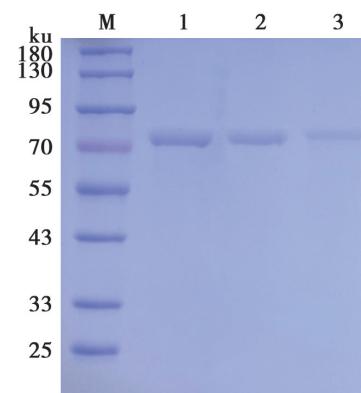
图 2 重组蛋白 DnaK 的表达鉴定及可溶性分析

A Expression of recombinant protein DnaK M Protein maker 1,3,5 Uninduced 28a-HL-DnaK/BL21, 28a-WR-DnaK/BL21, 28a-ML-DnaK/BL21 2,4,6 Induced 28a-HL-DnaK/BL21, 28a-WR-DnaK/BL21, 28a-ML-DnaK/BL21 B Solubility analysis of recombinant protein DnaK M Protein maker 1,3,5 Cellular lysate supernatant of 28a-HL-DnaK/BL21, 28a-WR-DnaK/BL21, 28a-ML-DnaK/BL21 2,4,6 Cellular lysate precipitation of 28a-HL-DnaK/BL21, 28a-WR-DnaK/BL21, 28a-ML-DnaK/BL21

Fig. 2 The prokaryotic expression and solubility analysis of recombinant protein DnaK

3 重组蛋白 DnaK 的纯化及 Western blot 分析

用 Ni-IDA Agarose 6FF 亲和层析柱纯化 3 种重组 DnaK 蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳检测纯化产物均为单一 70 ku 蛋白条带(图 3), 蛋白纯化效果良好。用抗 His 的鼠单克隆抗进行 Western blot 鉴定纯化的重组蛋白, 3 种蛋白均能被相应抗体识别(图 4A); 用兔抗猪链球菌 DnaK 蛋白多克隆抗体作为一抗进行 Western blot, 3 种蛋白同样均能被相应抗体识别(图 4B), 表明 3 株链球菌的 DnaK 重组蛋白均具有反应原性。

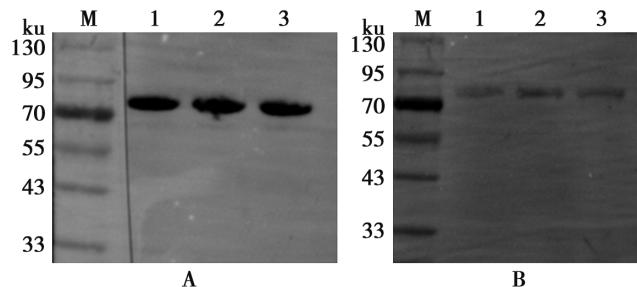


M 蛋白分子质量标准 1~3 分别为纯化的 *S. pyogenes* CVCC593, *S. agalactiae* S001, *S. equi* ATCC35246 重组 DnaK 蛋白

图 3 纯化 DnaK 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

M Protein maker 1~3 Purified recombinant protein DnaK of strain *S. pyogenes* CVCC593, *S. agalactiae* S001 and *S. equi* ATCC35246

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified recombinant protein DnaK



A 以 His 标签抗体为一抗的 DnaK 重组蛋白 Western blot 鉴定 M 蛋白分子质量标准 1~3 分别为纯化 *S. pyogenes* CVCC593, *S. agalactiae* S001, *S. equi* ATCC35246 DnaK 重组蛋白与 His 标签抗体反应条带 B 以兔抗猪链球菌 2 型 DnaK 蛋白多克隆抗体为一抗的 DnaK 重组蛋白 Western blot 分析 M 蛋白分子质量标准 1~3 分别为纯化 *S. pyogenes* CVCC593, *S. agalactiae* S001, *S. equi* ATCC35246 DnaK 重组蛋白与兔抗猪链球菌 2 型 DnaK 蛋白多克隆抗体反应条带。

图 4 DnaK 重组蛋白的 Western blot 分析

A Western blot identification of recombinant protein DnaK with His-labeled antibody as primary antibody B Western blot analysis of recombinant protein DnaK with rabbit anti-DnaK of *S. suis* polyclonal antibody as primary antibody M Protein maker 1~3 Recombinant protein DnaK of strain *S. pyogenes* CVCC593, *S. agalactiae* S001 and *S. equi* ATCC35246

Fig. 4 Western blot analysis of recombinant protein DnaK

4 DnaK 蛋白的生物信息学分析

4.1 氨基酸序列同源性 比对 *S. pyogenes*, *S.*

agalactia、*S. equi*、*S. suis* 等 4 种链球菌的 DnaK 氨基酸序列, 其同源性高达 91.16% (图 5)。

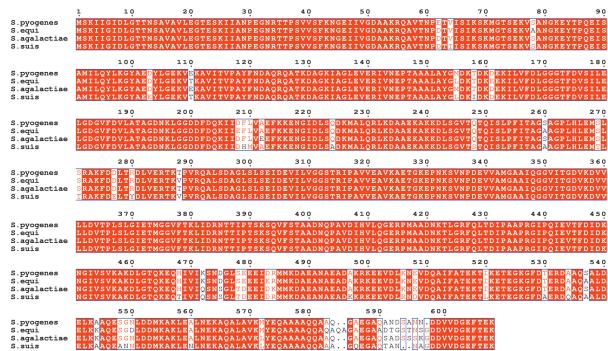


图 5 DnaK 氨基酸序列比对分析

Fig. 5 Amino acid sequence analysis of DnaK

4.2 信号肽及亚细胞定位分析 预测 DnaK 蛋白无信号肽。PSORT II Prediction 在线预测 DnaK 蛋白定位在细胞质的可能性为 73.9%, 定位在细胞核和线粒体的可能性分别为 13.0% 和 8.7%, 在液泡、分泌小泡、高尔基体的可能性为 4.3%。

4.3 二、三级结构 SOPMA 预测链球菌蛋白的二级结构由无规则卷曲、 α -螺旋、 β -转角和延伸链组成(图 6), 不同类群链球菌其二级结构类型占比有所差异, 结果如表 2。其中 α -螺旋占比最高为 *S. suis* (45.47%), 无规则卷曲占比最高为 *S. equi* (29.30%)。以 SWISS MODEL 在线软件对 DnaK 蛋白的三级结构进行预测, 结果如图 7。

表 2 DnaK 蛋白二级结构占比 (%)

Table 2 Predicted proportion of secondary structure of DnaK protein

链球菌型别 Type of <i>Streptococcus</i>	α -螺旋占比 (%) Proportion of α -helix	延伸链占比 (%) Proportion of extended strand	β -转角占比 (%) Proportion of β -turn	无规则卷曲占比 (%) Proportion of random coil
化脓性链球菌	45.39	21.38	6.58	26.64
无乳链球菌	43.84	21.18	7.06	27.91
马链球菌兽疫亚种	42.88	20.46	7.36	29.30
猪链球菌	45.47	20.92	7.25	26.36

4.4 蛋白互作网络 利用 STRING 数据库在线分析与 DnaK 蛋白发生相互作用的蛋白, 结果显示链球菌 DnaK 蛋白能够与 DnaJ、grpE、hrcA 等蛋白相互作用(图 8)。排名前 10 的蛋白如表 3 所示, 不同链球菌 DnaK 蛋白对于同种互作蛋白相关性得分存在差异, 得分越高, 其互作关系可信度越高。

讨 论

DnaK 蛋白是一类热休克蛋白, 也称为 HSP70 家族蛋白, 能增强细菌在压力环境下的生存能力, 在细菌感染和致病过程中发挥重要作用, 也可作为治疗细菌

感染的潜在靶标分子^[3-13]。本研究利用表达载体 pET-28a 原核表达并纯化 *S. pyogenes*、*S. agalactiae*、*S. equi* 的 DnaK 蛋白, 以实验室前期制备的猪链球菌 DnaK 兔多克隆抗体为一抗进行 Western blot 检测, 特异性反应条带与预期大小相近, 说明不同种链球菌之间 DnaK 蛋白同源性高, 且具有相似的抗原表位。

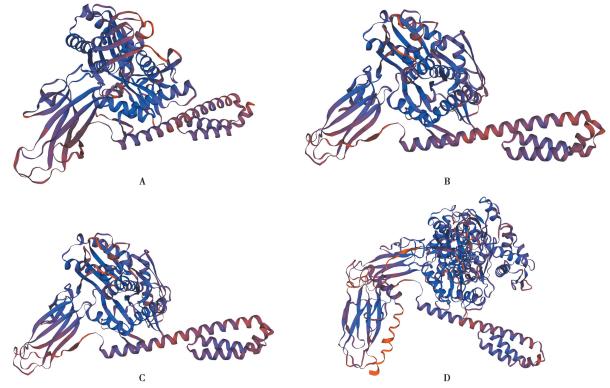


A *S. pyogenes* DnaK 二级结构 B *S. agalactiae* DnaK 二级结构 C *S. equi* DnaK 二级结构 D *S. suis* DnaK 二级结构 (c: 无规则卷曲; h: α -螺旋; t: β -转角; e: 延伸链)

Fig. 6 Prediction of the secondary structure of DnaK protein

A *S. pyogenes* DnaK 二级结构 B *S. agalactiae* DnaK 二级结构 C *S. equi* DnaK 二级结构 D *S. suis* DnaK 二级结构 (c: Random coil; h: α -helix; t: β -turn; e: Extended strand)

Fig. 6 Prediction of the secondary structure of DnaK protein



A *S. pyogenes* DnaK 三级结构 B *S. agalactiae* DnaK 三级结构 C *S. equi* DnaK 三级结构 D *S. suis* DnaK 三级结构

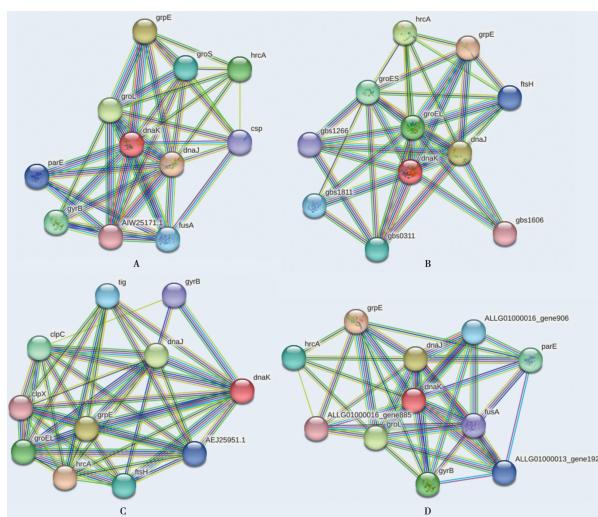
Fig. 7 Prediction of the tertiary structure of DnaK protein

比对分析 *S. pyogenes*、*S. agalactiae*、*S. equi*、*S. suis* 的 DnaK 蛋白氨基酸序列, 其同源性在 90% 以上, 提示 DnaK 蛋白在链球菌中可能具有相似的功能。亚细胞定位及信号肽预测显示, DnaK 蛋白主要分布于细菌细胞质中, 无信号肽。然而, 据报道 DnaK

能定位于多种细菌表面,被称为 moonlighting 蛋白,具有多种生物学活性^[14-15]。缺陷乏养菌 DnaK 蛋白可作为黏附素,与宿主细胞相互作用,并诱导促炎性细胞因子的分泌,促进细菌感染^[16]。结核分枝杆菌、脑膜炎奈瑟氏球菌和动物双歧杆菌表面的 DnaK 蛋白能够识别纤溶酶原,参与细菌的毒力作用^[15,17-18]。此外, Henderson 等^[19]报道细菌能够在其表面表达多种分子伴侣蛋白,并分泌到细胞外,作为毒力信号分子。因此,细菌 DnaK 蛋白除了位于细胞质和细菌表面外,还可能分泌到细菌胞外,参与细菌的感染与致病。

表 3 DnaK 互作蛋白及相关性得分
Table 3 DnaK interacting proteins and correlation scores

序号	化脓性链球菌 <i>S. pyogenes</i>		无乳链球菌 <i>S. agalactiae</i>		马链球菌兽疫亚种 <i>S. equi</i>		猪链球菌 <i>S. suis</i>	
	互作蛋白 Interaction protein	得分 Score	互作蛋白 Interaction protein	得分 Score	互作蛋白 Interaction protein	得分 Score	互作蛋白 Interaction protein	得分 Score
1	DnaJ	0.999	GrpE	0.999	HrcA	0.999	GrpE	0.997
2	GrpE	0.999	DnaJ	0.999	GrpE	0.999	DnaJ	0.992
3	GroL	0.999	HrcA	0.992	DnaJ	0.999	GroL	0.987
4	HrcA	0.997	GroEL	0.980	GroEL	0.998	GyrB	0.954
5	GyrB	0.981	GroES	0.936	ClpC	0.991	ParE	0.947
6	GroS	0.975	Gbs0311	0.923	FtsH	0.978	HrcA	0.933
7	FusA	0.958	Gbs1811	0.920	Tig	0.975	ALLG01000016_gene906	0.927
8	ParE	0.958	FtsH	0.918	AEJ25951.1	0.974	ALLG01000013_gene1924	0.919
9	Csp	0.949	Gbs1266	0.916	GyrB	0.967	FusA	0.905
10	AIW25171.1	0.938	Gbs1606	0.916	ClpX	0.965	ALLG01000016_gene885	0.894



A *S. pyogenes* DnaK 互作蛋白 B *S. agalactiae* DnaK 互作蛋白
C *S. equi* DnaK 互作蛋白 D *S. suis* DnaK 互作蛋白

图 8 DnaK 蛋白互作网络分析

A Protein-protein interaction network of *S. pyogenes* DnaK B Protein-protein interaction network of *S. agalactiae* DnaK C Protein-protein interaction network of *S. equi* DnaK D Protein-protein interaction network of *S. suis* DnaK

Fig. 8 Protein-protein interaction network analysis of DnaK protein

蛋白的二级结构与抗原表位的分布密切相关,α-螺旋位于蛋白质内部,是支撑蛋白质二级结构的基本骨架,对于维持蛋白质二级结构的稳定性起重要作用,一般不作为抗原表位,而无规则卷曲和β-转角结构松散突出,主要位于蛋白质表面,容易与配体结合,成为抗原表位的几率较大^[20-21]。预测链球菌 DnaK 蛋白的二级结构,占比最高的为 α-螺旋,说明该蛋白具有良好的结构稳定性。预测无规则卷曲占比较高,提示该蛋白可能有多个抗原表位位于无规则卷曲。DnaK 蛋白三级结构预测采用同源建模分析的方法,成功模拟该蛋白的三级结构模型,为蛋白的功能研究奠定了基础。

STRING 数据库中包含有大量物种的蛋白质—蛋白质相互作用信息,本研究通过该数据库分别预测 *S. pyogenes*、*S. agalactiae*、*S. equi* 和 *S. suis* 的 DnaK 蛋白互作网络,结果显示 4 种链球菌的 DnaK 与 DnaJ、GrpE、HrcA 蛋白互作的可能性均较高。细菌 DnaJ 与真核细胞中的 HSP40 同源,DnaJ 能够与 DnaK 互作,作为 DnaK 的伴侣蛋白与 DnaK 组成分子伴侣复合体,在蛋白质折叠、组装过程中发挥重要作用。当细胞内的蛋白质发生错误折叠时,DnaJ 能够通过其 J 区域与错误折叠的蛋白结合,形成一个 DnaJ-蛋白复合物。然后,DnaJ 将该复合物传递给 DnaK,同时 DnaK 结合 ATP 并水解成 ADP,使 DnaK 发生构象变化,从而使其 N 末端的 K 区域能够与 DnaJ-蛋白复合物结合。DnaK 将该复合物“包裹”住,并防止其继续错误折叠^[22-23]。GrpE 是 DnaK 的核苷酸交换因子,未折叠的蛋白质最初与 DnaJ 结合,与 DnaJ 结合蛋白相互作用后,DnaK 水解其结合的 ATP,从而形成稳定的复合物。GrpE 从 DnaK 释放 ADP;ADP 与 DnaK 的结合触发底物蛋白的释放,从而完成反应循环。DnaJ、DnaK 和 GrpE 之间需要几轮 ATP 依赖的相互作用才能完全有效地折叠^[24]。HrcA 是 DnaK 和 GroESL 操纵子的负调节因子,正常条件下 HrcA 与 CIRCE 序列结合,并抑制 DnaK 操纵子相关基因 *DnaK*、*GrpE* 及 *DnaJ* 的表达,在应激条件下,HrcA 和 GroESL 复合物结合,释放 CIRCE 序列,抑制作用被解除,相关基因表达量上升。HrcA 的调控机制有助于维持细胞的正常功能^[25-26]。蛋白质互作网络分析可为蛋白质结构和功能域预测提供线索,有助于解析蛋白质结构和功能的关系。

本研究构建了 A、B、C 群链球菌 DnaK 蛋白的重组表达载体,获得了可溶性表达的纯度较高的 DnaK 蛋白,生物信息学分析 A、B、C 群链球菌的 DnaK 蛋白与 R 群链球菌的 DnaK 蛋白同源性高,且该蛋白主要存在于细胞质中,为进一步研究 DnaK 在链球菌感染

致病中的作用和分子机制奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Genest O, Wickner S, Doyle SM. Hsp90 and Hsp70 chaperones: Collaborators in protein remodeling[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(6):2109-2120.
- [2] Zhang H, Yang J, Wu S, et al. Glutathionylation of the bacterial Hsp70 chaperone DnaK provides a link between oxidative stress and the heat shock response[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(13):6967-6981.
- [3] Ghazaei C. Role and mechanism of the Hsp70 molecular chaperone machines in bacterial pathogens[J]. *J Med Microbiol*, 2017, 66(3):259-265.
- [4] Huesca M, Goodwin A, Bhagwansingh A, et al. Characterization of an acidic-pH-inducible stress protein (hsp70), a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori*[J]. *Infect Immun*, 1998, 66(9):4061-4067.
- [5] Tomoyasu T, Tabata A, Imaki H, et al. Role of *Streptococcus intermedius* DnaK chaperone system in stress tolerance and pathogenicity[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2012, 17(1):41-55.
- [6] Liu N, Sun C, Cui G, et al. The Rab1 in host cells modulates *Brucella* intracellular survival and binds to Brucella DnaK protein[J]. *Arch Microbiol*, 2016, 198(9):923-931.
- [7] 于瑞. 猪链球菌耐药相关可移动遗传元件的鉴定及其水平传播机制[D]. 郑州:河南农业大学, 2022.
- [8] Hamada S, Kawabata S, Nakagawa I. Molecular and genomic characterization of pathogenic traits of group A *Streptococcus pyogenes*[J]. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2015, 91(10):539-559.
- [9] Raabe VN, Shane AL. Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*) [J]. *Microbiol Spectr*, 2019, 7(2):10.
- [10] Turner CE, Bubba L, Efstratiou A. Pathogenicity factors in group C and G streptococci[J]. *Microbiol Spectr*, 2019, 7(3).
- [11] Gottschalk M, Xu J, Calzas C, et al. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? [J]. *Future Microbiol*, 2010, 5(3):371-391.
- [12] Pei X, Liu M, Zhou H, et al. Screening for phagocytosis resistance-related genes via a transposon mutant library of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Virulence*, 2020, 11(1):825-838.
- [13] Lee JH, Jeon J, Bai F, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* HSP70-like protein DnaK induces IL-1 β expression via TLR4-
- ~~~~~
(上接 1244 页)
- [8] Yuan H, Chan Y, Xu FX, et al. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(9):1141-1149.
- [9] Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*[J]. *Mol Biotechnol*, 2000, 16(1):23-52.
- [10] Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY, et al. *Pichia pastoris* as a host system for transformations[J]. *Mol Cell Biol*, 1985, 5(12):3376-3385.
- [11] Weinacker D, Rabert C, Zepeda AB, et al. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry[J]. *Braz J Microbiol*, 2013, 44(4):1043-1048.
- [12] 罗竟红,游自立. 巴斯德毕赤酵母表达系统在外源基因表达中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2007(03):75-79.
- [13] Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, et al. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*[J]. *Mol Cell Biol*, 1989, 9(3):1316-1323.
- dependent activation of the NF- κ B and JNK signaling pathways [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2019, 67:101373.
- [14] Li Y, Wang J, Liu B, et al. DnaK functions as a moonlighting protein on the surface of *Mycoplasma hyorhinis* cells[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13:842058.
- [15] Candela M, Centanni M, Fiori J, et al. DnaK from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* is a surface-exposed human plasminogen receptor upregulated in response to bile salts[J]. *Microbiology (Reading)*, 2010, 156(Pt 6):1609-1618.
- [16] Sasaki M, Shimoyama Y, Kodama Y, et al. *Abiotrophia defectiva* DnaK promotes fibronectin-mediated adherence to HUVECs and induces a proinflammatory response[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16):8528.
- [17] Xolalpa W, Vallecillo AJ, Lara M, et al. Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Proteomics*, 2007, 7(18):3332-3341.
- [18] Knaust A, Weber MV, Hammerschmidt S, et al. Cytosolic proteins contribute to surface plasminogen recruitment of *Neisseria meningitidis*[J]. *J Bacteriol*, 2007, 189(8):3246-3255.
- [19] Henderson B, Allan E, Coates AR. Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection [J]. *Infect Immun*, 2006, 74(7):3693-3706.
- [20] Wang F, Ye B. In silico cloning and B/T cell epitope prediction of triosephosphate isomerase from *Echinococcus granulosus*[J]. *Parasitol Res*, 2016, 115(10):3991-3998.
- [21] 陆宝燕,王宁,赵鹏鹏,等. 细粒棘球绦虫 TSP 3 基因的生物信息学分析及原核表达[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(11):1297-1302.
- [22] Mayer MP. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism[J]. *Trends Biochem Sci*, 2013, 38(10):507-514.
- [23] 张梦姣. 大肠埃希菌杆菌热休克蛋白 DnaK 和 DnaJ 对细胞周期的影响[D]. 内蒙古大学, 2017.
- [24] Harrison C. GrpE, a nucleotide exchange factor for DnaK[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2003, 8(3):218-224.
- [25] Woodbury R, Haldenwang WG. HrcA is a negative regulator of the dnaK and groESL operons of *Streptococcus pyogenes*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 302(4):722-727.
- [26] 卢良坤. 嗜盐四联球菌 clpB, dnaK, hrcA 基因在耐盐机制中的相互作用[D]. 华南理工大学, 2013.

【收稿日期】 2023-05-24 【修回日期】 2023-08-05

- [14] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system [J]. *YEAST*, 2005, 22(4):249-270.
- [15] Wrapp D, Wang N, Corbett KK, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation[J]. *Science (New York, N. Y.)*, 2020, 367(6483):1260-1263.
- [16] Cui J, Li F, Shi ZL, et al. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17:181-192.
- [17] Yan R, Zhang Y, Li Y, et al. Structural basis for the recognition of the SARS-CoV-2 by full length human ACE2[J]. *Science*, 2020, 367(6485):eabb2762.
- [18] Byrne B, Kim H, Yoo SJ, et al. *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2015, 32(1):9-17.

【收稿日期】 2023-05-31 【修回日期】 2023-08-14