DOI:10.16016/j.1000-5404.201411153

论著

肺炎链球菌三磷酸甘油醛脱氢酶GAPDH与热休克蛋白DnaJ的相互作用

马 峰[1],王建敏[2],王丽滨[2],宋志新[2],徐红梅[2],邢 燕[2],粟玉凤[2],张雪梅[2],孟江萍[1] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院辅助生殖中心[1],临床检验诊断学教育部重点实验室[2])

[摘要] **目的** 验证肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, *S. pn*)糖酵解关键酶三磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)和热休克蛋白DnaJ的相互作用。**方法** PCR扩增*S. pn* D39 GAPDH蛋白编码基因gap全长,将其克隆至pET-28a(+),重组质粒经PCR、双酶切及测序鉴定正确后转化大肠杆菌BL21(DE3),IPTG诱导GAPDH-6His的表达,经Ni-NTA亲和层析柱纯化后,用SDS-PAGE鉴定其纯度。重组GAPDH蛋白经腹部皮下免疫昆明小鼠获得多克隆抗体。Western blot鉴定GAPDH的保守性。采用大肠杆菌双杂交系统、直接结合实验、生物膜层干涉技术(Bio-layer Interferometry, BLI)验证GAPDH和DnaJ的相互作用。**结果** 获得了纯度达90%的GAPDH重组蛋白,并获得了效价达10^7的抗GAPDH多克隆抗体,Western blot检测显示在7株不同血清型*S. pn*的全菌裂解液和培养上清中均存在和抗GAPDH抗体反应的特异性条带。大肠杆菌双杂交系统显示GAPDH和DnaJ共转化菌株能够在3-AT平板及双选择培养平板上生长,提示二者在细菌胞内有相互作用。直接结合实验和BLI显示随着加入GAPDH蛋白浓度的增加,二者的结合量也增加,提示GAPDH和DnaJ的结合具有浓度依赖性。BLI实验也显示GAPDH和DnaJ的亲和常数为1.12×10^{-7} mol/L。**结论** 糖酵解关键酶GAPDH在肺炎链球菌中保守表达,且为分泌性蛋白;该蛋白和热休克蛋白DnaJ在细胞内存在相互作用,且为直接相互作用。

[关键词] 肺炎链球菌;三磷酸甘油醛脱氢酶;热休克蛋白DnaJ;蛋白相互作用
[中图法分类号] R345;R378.12;R392.2 [文献标志码] A

GAPDH, a glycolytic enzyme, interacts with heat shock protein DnaJ in *Streptococcus pneumoniae*

Ma Feng[1], Wang Jianmin[2], Wang Libin[2], Song Zhixin[2], Xu Hongmei[2], Xing Yan[2], Su Yufeng[2], Zhang Xuemei[2], Meng Jiangping[1] ([1]Center for Assisted Reproduction, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostic Medicine of Ministry of Education, School of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the interaction between heat shock protein DnaJ and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a key enzyme of glycolysis, in *Streptococcus pneumoniae* (*S. pn*). Methods The full-length gene of gap was amplified by PCR with specific primers from *S. pn* D39 and then cloned into the expression vector pET-28a(+). Recombinant pET-28a(+)-gap was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and induced with IPTG to express 6 His-tagged GAPDH. The affinity chromatography column was used to purify recombinant GAPDH, followed by SDS-PAGE to test its purity. The recombinant GAPDH was used to immunize kunming mice to prepare polyclonal antibodies. The antibody titer was tested by ELISA and the conservation of GAPDH was confirmed by Western blotting. The interaction between GAPDH and DnaJ was validated by BacterioMatch II two-hybrid system, direct binding assay and bio-

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81171532)
[通信作者] 孟江萍, E-mail:mjlily2000@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150410.1459.006.html(2015-04-10)

layer interferometry (BLI). **Results** Recombinant GAPDH was successfully expressed with a purity of 90%, and its polyclonal antibodies (a titer of 10^7) were obtained. Western blotting showed a specific band recognized by GAPDH antibody in the whole cell and culture medium from 7 serotypes of *S. pn*. BacterioMatch II two-hybrid system suggested that GAPDH interacted with DnaJ *in vivo*. Both direct binding assay and BLI demonstrated that GAPDH directly interacted with DnaJ in a concentration-dependent manner. BLI also showed that their affinity constant reach to 1.12×10^{-7} mol/L. **Conclusion** GAPDH is a highly conserved secretion protein and directly interacts with DnaJ, which is important to determine the effects of DnaJ to GAPDH on its secretion and violence in *S. pn*.

[**Key words**] *Streptococcus pneumonia*; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; heat shock protein DnaJ; protein interaction

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81171532). Corresponding author: Meng Jiangping, E-mail:mjlily2000@163.com

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumonia*, *S. pn*)是一种常见的条件致病菌,也是引起社区获得性感染的主要病原菌。它通常定植于正常人群的鼻咽部,一般不会引起疾病,但是当机体免疫力低下时,可以导致侵袭性疾病如肺炎,脑膜炎和菌血症[1]。世界卫生组织估算全球每年约160万人死于肺炎链球菌的感染,5岁以下儿童达100万[2]。因此,明确 *S. pn* 的致病机制,对它的预防和治疗都有重要意义。三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)是一个多功能蛋白,它不仅是参与糖酵解的关键酶,也是病原菌的一个重要毒力因子[3-4]。胞内表达的GAPDH是参与糖酵解的关键酶,催化3-磷酸甘油醛生成1,3-二磷酸甘油酸。表面表达的GAPDH参与了病原菌在宿主内的定植、侵袭过程[5-6],通过结合纤溶酶原、纤溶酶、纤连蛋白、补体C1q等,促进 *S. pn* 在宿主的定植和侵袭[7-10]。作为一个重要的毒力因子,GAPDH既可以定位到病原菌表面,也可以分泌到胞外;GAPDH和烯醇化酶(enolase, Eno)、溶血素(pneumolysin, Ply)一样,都属于非经典分泌蛋白,与经典的分泌蛋白不同,它们缺乏N末端分泌信号肽和C末端细胞壁锚定序列LPXTG序列,但都可以定位到细胞表面及分泌到胞外,目前它们的分泌机制还不清楚[11-12]。文献报道,在大肠杆菌中分子伴侣DnaJ/Dank/GrpE参与了蛋白的分泌过程[13-14],但是在革兰阳性菌中目前还少见详细报道。本课题组前期研究中筛选到9个和DnaJ相互作用的蛋白,包括GAPDH。已经证明了DnaJ和Eno、SpxB(丙酮酸氧化酶)、Dank具有相互作用,并且在 *S. pn* D39中DnaJ缺陷后,非经典分泌蛋白Eno的上清表达显著下调,提示其在 *S. pn* 中可能调控了一些非经典分泌蛋白的分泌[15]。对于DnaJ和GAPDH是否具有相互作用以及DnaJ在GAPDH分泌中是否发挥了一定的作用,目前尚不清楚。

要探讨DnaJ是否在GAPDH的分泌过程中发挥作用,首先需确证二者是否在细胞内有相互作用、是间接作用还是直接作用。本研究在获得 *S. pn* GAPDH的重组蛋白后,采用大肠杆菌双杂交、直接结合实验、生物膜层干涉技术(BLI)反复验证GAPDH和DnaJ的相互作用。通过GPPDH的多克隆抗体鉴定其在细菌中的保守性,以期为下一步功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~8周雌性KM小鼠12只,体质量25 g左右,购买于重庆医科大学实验动物中心,喂养于SPF级实验室。实验动物许可证号为SYXK(渝)2007-0001。

1.2 菌株和质粒

肺炎链球菌NCTC7466(D39,血清型2型)购于英国典型菌种保藏中心,TIGR4(血清型4型)购于美国典型微生物菌种保藏中心,CMCC(B)31109(1型血清型)、CMCC(B)31207(6B血清型)、CMCC(B)31614(14血清型)、CMCC(B)31693(19F血清型)、CMCC(B)31759(23F血清型)菌株购于中国医学细菌保藏管理中心,培养于C+Y半合成培养基。原核表达质粒pET-28a(+),*E. coli* BL21(DE3),感受态为本实验室保存。大肠杆菌双杂交系统购于Agilent公司。培养基为LB培养基。

1.3 主要试剂

质粒提取试剂盒(Omega),DNA片段纯化试剂盒(Roche),细菌基因组提取试剂盒(TIANGEN),限制性内切酶*Bam*HⅠ、*Xho*Ⅰ、PrimeStar高保真DNA聚合酶(TaKaRa),T4连接酶(Promega),异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、完全弗氏佐剂(CFA)和不完全弗氏佐

剂(IFA)(Sigma),Ni-NTA 亲和层析柱(Novagen),引物合成(生工),测序(北京华大),HRP 标记的羊抗鼠 IgG(中杉金桥),3-氨基-1,2,4-三唑(3-AT)(Sigma),Protease Inhibitor Cocktail 为 BBI 产品。

1.4 目的基因 gap 扩增

根据 GenBank 中 *S. pn* D39 gap 基因序列(Seq:NC_008533.1)设计引物:P1:5′-CGCGGATCCATGGTAGTTAAAGTTGGTATTAACG-3′,含 *Bam*H Ⅰ酶切位点;P2:5′-CCGCTCGAGTTATTTAGCAATCTTTGCGAAGTAT-3′,含 *Xho* Ⅰ酶切位点。*S. pn* 用 C+Y 半合成培养基培养至 *D*(600)为 0.4~0.5,提取基因组 DNA,作为模板,PCR 扩增 gap 基因。扩增体系为:5×PS buffer(含 Mg^{2+})10.0 μL,dNTP(10 mmol/L)4.0 μL,P1、P2(10 pmol/L)各 1.0 μL,*S. pn* D39 基因组 DNA 2.0 μL,PrimeStar 0.3 μL,ddH_2O 31.7 μL。扩增条件:98 ℃变性 10 s、52 ℃退火 15 s、72 ℃延伸 1 min 20 s,共 32 个循环;72 ℃延伸 5 min;4 ℃保存。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 ℃。

1.5 重组质粒的构建及蛋白诱导表达和纯化

gap 基因全长片段和质粒 pET-28a(+)用限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切后,回收酶切产物进行连接反应。连接产物转化感受态 *E. coli* BL21(DE3),铺于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 抗性平板。阳性克隆经 PCR 鉴定正确后,提取质粒进行双酶切鉴定。双酶切鉴定正确的阳性克隆送北京六合华大基因科技股份有限公司测序进一步鉴定。

将测序正确的阳性克隆 BL21-pET-28a(+)-gap 在 0.1 mmol/L IPTG、30 ℃、120 r/min 的条件下诱导表达 GAPDH 蛋白 15 h,然后通过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化,纯化步骤参照文献[16]。

1.6 GAPDH 多克隆抗体制备

多克隆抗体制备及效价测定参照文献[16],初次免疫 GAPDH 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;第二次和第三次免疫 GAPDH 蛋白均为 75 μg,不完全弗氏佐剂与蛋白溶液按体积 1:1 比例混合。末次免疫 7 d 后取鼠尾静脉血,分离血清,ELISA 测定效价。

1.7 GAPDH 在 *S. pn* 中保守性评价

7 种不同血清型 *S. pn* 培养至 *D*(600)=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,一抗为抗 GAPDH 多克隆(1:5 000 稀释),二抗为 HPR 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:5 000 稀释),化学发光检测。

1.8 大肠杆菌双杂交系统体内验证 GAPDH 和 DnaJ 的相互作用

大肠杆菌双杂交实验主要参照文献[17]。本实验采用新的 HIS3-aadA 双报告基因。靶质粒 pTRG 带四环素抗性基因(Tet^r),诱饵质粒 pBT 带氯霉素抗性基因(Cam^r)。HIS3 编码组氨酸合成途径的一个蛋白,报告菌 *E. coli* XL1-Blue MRF′ Kan 由于 HisB 的缺陷,在 HIS3 没有激活前,不能和 3-AT(组氨酸酶 3 的竞争性抑制剂)竞争利用培养基中的组氨酸,因此在含有 3-AT 的平板上不能生长。只有当待检测的两个蛋白相互作用时,可激活 HIS3 报告基因的转录,才能和 3-AT 竞争利用培养基中的组氨酸,可以在含有 3-AT 的平板上生长,继而激活下游的 aadA 基因(链霉素抗性基因,$Strep^r$),从而在含有 Strep 的平板上生长。如果检测蛋白没有相互作用,则只能在非选择平板上生长(含 12.5 μg/mL Tet,25 μg/mL Cam),在 3-AT 平板(含 12.5 μg/mL Tet,25 μg/mL Cam,5 mmol/L 3-AT)及双选择平板(含 12.5 μg/mL Tet,25 μg/mL Cam,5 mmol/L 3-AT,12.5 μg/mL Strep)上均不能生长。

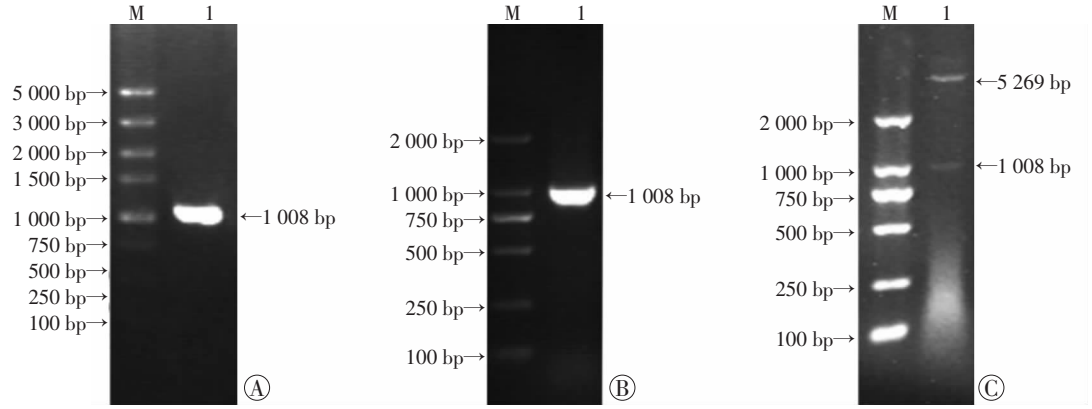
靶质粒构建:以 P1、P2 为引物,*S. pn* D39 基因组为模板扩增 gap 基因,克隆入靶质粒 pTRG,转化 *E. coli* XL1-Blue MRF′Kan 感受态细胞,以 Tet 抗性的 LB 平板进行筛选。经 PCR、双酶切、DNA 测序鉴定,鉴定正确的质粒命名为 pTRG-gap。

将靶质粒和诱饵质粒共转化到 *E. coli* XL1-Blue MRF′Kan 感受态细胞中,铺于非选择性平板,用 pTRG 和 pBT 通用引物菌液 PCR 鉴定是否转入双质粒,扩增体系及引物参照文献[17]。双质粒阳性的菌分别铺于 3-AT 平板和双选择性平板,37 ℃培养,观察是否生长。

共转化质粒分组:实验组为 pTRG-gap 和 pBT-dnaJ(pBT-dnaJ 为本实验室前期构建);阴性对照组为 pTRG 和 pBT-dnaJ、pTRG-gap 和 pBT;阳性对照组为 pTRG-$Gal11^P$和 pBT-LGF2(系统自带)、pTRG-dnaK 和 pBT-dnaJ(本实验室前期构建)。

1.9 直接结合实验体外验证 GAPDH 和 DnaJ 的相互作用

直接结合实验可以验证两个蛋白之间是否具有直接的相互作用,基本原理类似 ELISA。用 pH 9.6 的碳酸钠缓冲液将 DnaJ-flag 蛋白(重庆泽恒生物技术有限公司表达与纯化)稀释成 5 μg/mL,100 μL/孔 4 ℃包被过夜,1% BSA 作为阴性对照。洗板 3 次,每孔加入 200 μL 5% 脱脂奶粉,37 ℃封闭 2 h;洗板 3 次,用封闭液将 GAPDH 蛋白稀释成不同的浓度(0~200 μg/mL),100 μL/孔,37 ℃孵育 1 h;洗板 3 次,每孔加入 100 μL



A:gap 基因扩增 M:DL5000DNA 标准;1:gap 基因扩增产物;B:BL21-pET-28a(+)-gap PCR 鉴定 M:DL2000 标准;1:BL21-pET-28a(+)-gap PCR 鉴定产物;C:质粒 pET-28a(+)-gap *Bam*HⅠ及 *Xho*Ⅰ双酶切 M:DL2000 标准;1:质粒 pET-28a(+)-gap *Bam*HⅠ及 *Xho*Ⅰ双酶切产物

图1 重组表达质粒 pET-28a(+)-gap 构建与鉴定

鼠抗 GAPDH 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 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体(1∶5 000 稀释),37 ℃孵育 45 min;洗板 6 次,TMB 显色 15 min,100 μL/孔 2 mol/L H_2SO_4 终止反应后,450 nm 测吸光度值。

1.10 BLI 验证 GAPDH 和 DnaJ 的相互作用

BLI 的基本原理是生物分子结合到传感器表面会形成一层生物膜,生物膜对透过传感器的光波造成干涉现象,干涉现象以相位移动的方式被检测,从而可以检测到结合到传感器表面分子数量的变化。实验中利用 octeRED96 分子互作仪对 GAPDH 和 DnaJ 的相互作用进行实时监测及动力学参数计算。

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。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 GAPDH 蛋白稀释成 4.8、2.4、1.2、0.6 μmol/L,上样 200 μL,以 PBS 为空白对照。利用 Fortebio Octet RED96 大分子反应分析仪检测。

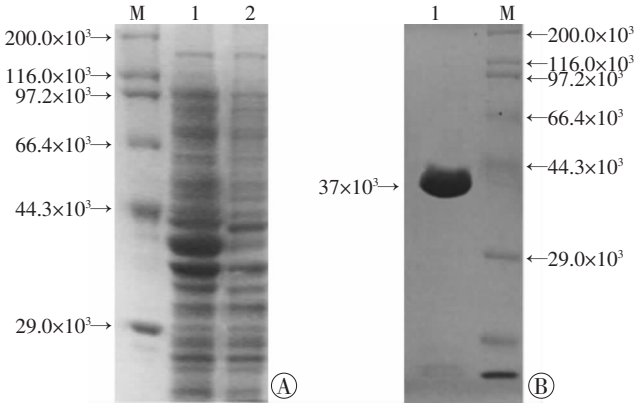
2 结果

2.1 重组表达质粒 pET-28a(+)-gap 的构建与鉴定

gap 基因 PCR 扩增产物,经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,在相对分子量 1 008 bp 位置有一条特异性条带,与 gap 基因全长相符(图 1A)。将此基因插入表达质粒 pET-28a(+)中,阳性克隆进行 PCR 鉴定,扩增到 1 008 bp 的目的基因(图 1B)。提取质粒进行双酶切也得到相同大小的条带(图 1C)。初步鉴定正确的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。

2.2 重组蛋白 GAPDH 的诱导表达及纯化

由 SDS-PAGE 可见,与未诱导菌相比,含有表达质粒 pET-28a(+)-gap 的重组菌 *E. coli* BL21(DE3)经 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导后,在相对分子质量约为 37×10^3 处有一条明显增粗的蛋白条带(图 2A)。超声破菌后上清经 Ni-NTA 树脂亲和层析纯化,超滤脱盐后 SDS-PAGE 分析发现所得重组 GAPDH 蛋白纯度达 90%(图 2B),可用于后续实验。



A:GAPDH 诱导表达 M:标准;1:诱导后重组菌;2:未诱导重组菌;B:纯化的 GAPDH SDS-PAGE 鉴定 1:纯化的 GAPDH 重组蛋白;M:标准

图2 SDS-PAGE 分析 GAPDH 重组蛋白的诱导表达及纯度

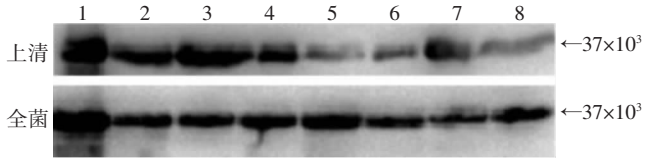
2.3 抗 GAPDH 多克隆抗体效价

重组 GAPDH 免疫 KM 小鼠 3 次后,分离血清,经间接 ELISA 法测定效价,结果显示,抗 GAPDH 多克隆

抗体效价可达 10^7。

2.4 GAPDH 保守性分析

Western blot 检测了 7 种不同血清型 *S. pn* 全菌裂解液及培养上清中 GAPDH 的表达，以重组 GAPDH 为阳性对照，结果显示在阳性对照处出现一条特异性条带（图 3），相对分子质量约为 37×10^3，说明抗 GAPDH 多克隆抗体可以特异性识别 GAPDH 蛋白。在 7 种不同血清型 *S. pn* 全菌裂解液和培养上清中均检测到了 GAPDH 的表达，说明 GAPDH 在 *S. pn* 中高度保守表达，同时也显示其具有保守的胞外分泌。



1：GAPDH 重组蛋白；2：CMCC（B）31109（1 型）；3：D39（2 型）；4：TIGR4（4 型）；5：CMCC（B）31207（6B 型）；6：CMCC（B）31614（14 型）；7：CMCC（B）31693（19F 型）；8：CMCC（B）31759（23F 型）

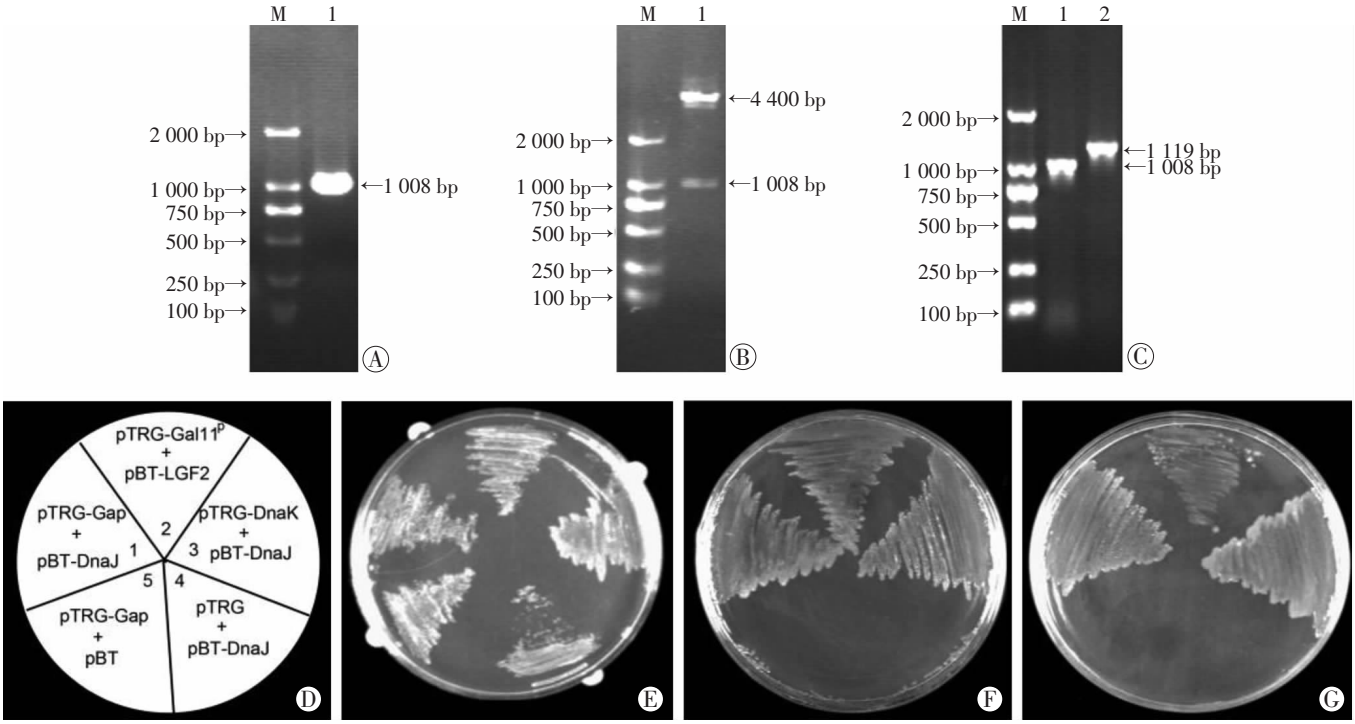
图 3　Western blot 检测 GAPDH 在 *S. pn* 中的保守性

2.5 大肠杆菌双杂交系统体内验证 GAPDH 和 DnaJ 的相互作用

靶质粒 pTRG-gap 经 PCR（图 4A）和双酶切鉴定（图 4B）正确，测序结果与 GenBank 公布的 gap 序列一致，说明靶质粒构建成功。实验组、阳性对照组和阴性对照组（图 4D），在非选择平板（图 4E）上均生长，提示双质粒共转化成功，实验组克隆经 PCR 鉴定证实成功转入双质粒 pTRG-Gap 和 pBT-DnaJ（图 4C）。非选择平板上的实验组及对照组克隆再转种到 3-AT 平板（图 4F）和双选择平板（图 4G）后，可以看到只有实验组及阳性对照组在 3-AT 平板和双选择平板生长，而阴性对照组未见生长，说明 GAPDH 和 DnaJ 在细胞内可以相互结合。

2.6 直接结合实验验证 GAPDH 和 DnaJ 的相互作用

以 BSA 为对照，将恒量的 DnaJ 和 BSA 包被于 96 孔板。把 GAPDH 看做 DnaJ 的一抗，按一定的浓度梯度加入 96 孔板，用抗 GAPDH 的多克隆抗体检测 GAPDH 是否和 DnaJ 有结合，如果有结合，说明 DnaJ 和 GAPDH 具有直接的相互作用。结果显示，与 BSA 对照组相比，随着 GAPDH 浓度的增加，GAPDH 和 DnaJ 的结合也增加，呈浓度梯度依赖的关系（图 5）。说明 GAPDH 和 DnaJ 能够直接相互结合。



A：靶质粒 pTRG-gap PCR 扩增　M：DL2000 标准；1：靶质粒 pTRG-gap PCR 扩增产物；B：靶质粒 pTRG-gap *Bam*H Ⅰ及 *Xho* Ⅰ双酶切　M：DL2000 标准；1：靶质粒 pTRG-gap *Bam*H Ⅰ及 *Xho* Ⅰ双酶切产物；C：靶质粒 pTRG-gap 及诱饵质粒 pBT-dnaJ 共转化 *E. coli* XL1-Blue MRF′ Kan PCR 鉴定　M：DL2000 标准；1：gap 扩增产物；2：dnaJ 扩增产物；D：平板示意图　1：实验组共转化菌；2：系统自带阳性对照共转化菌；3：已知阳性对照共转化菌；4：阴性对照质粒共转化菌；5：阴性对照质粒共转化菌；E：非选择平板（含 Tet，Cam）；F：3-AT 平板（含 Tet、Cam、3-AT）；G：双选择平板（含 Tet、Cam、3-AT、Strep）

图 4　大肠杆菌双杂交验证 GAPDH 和 DnaJ 的相互作用

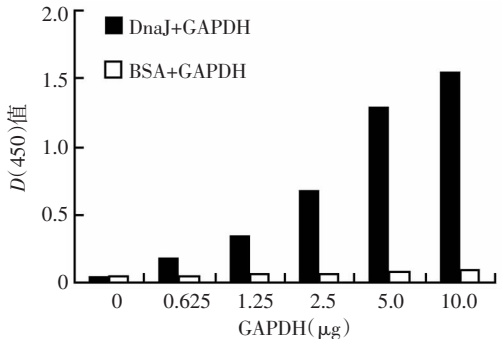


图5 直接结合实验验证 GAPDH 和 DnaJ 的相互作用

2.7 BLI 验证 GAPDH 和 DnaJ 的相互作用

在300 s之前,GAPDH 和 DnaJ 的结合呈浓度梯度依赖的关系,随着 GAPDH 浓度的增加,二者结合增加,与直接结合实验结果一致。在300 s之后,开始缓慢解离,最后达到结合解离平衡(图6)。通过 octeRED96 分子互作仪相对应软件计算二者相互作用参数,得出 GAPDH 和 DnaJ 相互作用的结合常数达 2.91×10^{3} $(mol \cdot s)^{-1}$,解离常数达 3.25×10^{-4} s^{-1},亲和常数达到了 1.12×10^{-7} mol/L,说明二者具有较强的结合力和较高的亲和力,再次证明 GAPDH 和 DnaJ 具有直接的相互作用。

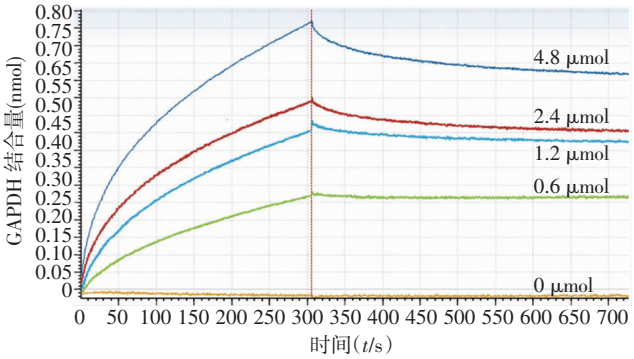


图6 BLI 验证 GAPDH 和 DnaJ 的相互作用

3 讨论

蛋白相互作用的验证是进行其功能研究的基础。我们前期研究显示,DnaJ 可能参与 GAPDH 的非经典分泌[15],需要确证二者是否有相互作用。目前有多种鉴定蛋白相互作用的方法,包括酵母双杂交系统、细菌双杂交系统、免疫共沉淀、直接结合实验、BLI 等,在进行相互作用研究时需要根据实情进行考虑。

酵母双杂交系统是基于真核细胞转录因子的作用原理而建立的[18]。细菌双杂交系统是利用转录激活的原理检测蛋白质之间的相互作用,能在活体内鉴定蛋白质的相互作用,具有高度敏感性,对蛋白质之间微弱的、瞬间的作用也能检测到的优点。与酵母双杂交相比,细菌的转化效率显著高于酵母细胞,这为更加高通量地筛选文库提供了条件;诱饵和靶蛋白不需要定位信号,避免了酵母内源蛋白所引起的假阳性以及减少了自激活阳性率。细菌双杂交系统的缺点在于缺乏翻译后修饰系统,真核蛋白可能不会被正确的折叠及翻译后修饰[18]。免疫共沉淀是以抗原和抗体之间专一性作用为基础的用于研究蛋白质之间相互作用的经典方法。其优点是相互作用蛋白都是翻译后修饰的,处于天然状态,二者相互作用也是在自然状态下进行,避免了人为的影响。缺点是检测不到低亲和力和瞬间的蛋白质-蛋白质相互作用。对于原核生物来讲,细菌双杂交就不存在翻译后修饰的问题。由于其敏感度高,能较好的反应自然状态下的蛋白结合情况,因此本研究首先采用该方法验证了 GAPDH 与 DnaJ 的相互作用。然而,细菌双杂交虽然能够反映蛋白的相互作用,但不能确定二者是否有直接相互作用。而免疫共沉淀也同样具有这个缺点。因此需要选择其他方法验证二者是否有直接相互作用。

直接结合实验和 BLI 都是活体外验证蛋白相互作用的方法,而 BLI 还可实时监测蛋白之间的相互作用,同时测定蛋白质之间相互作用的动力学参数。由于活体外实验过程中,蛋白不一定与自然状态相吻合,其结果容易出现假阳性和假阴性。因此,对于活体外的验证实验我们采用了这两种方法,以增加结果的可靠性。实验结果显示,GAPDH 与 DnaJ 在这两种验证方法中都表现出较强的结合,提示二者确实有直接相互作用。

GAPDH 作为糖酵解的关键酶,在胞内均保守表达,但是作为一个重要的多功能蛋白,GAPDH 发挥其毒力效应的基础是其在病菌的表面定位及胞外分泌[7-9]。目前对于 GAPDH 胞外分泌是否保守存在尚无直接证据。本研究验证了 GAPDH 在国内常见血清型1、2、4、6B、14、19F 和23F 菌株中均有保守性分泌,为其毒力作用机制研究提供了一定的实验依据。

综上所述,本研究证实了 GAPDH 在 *S. pn* 胞内保守表达、胞外保守性分泌,并证实了 GAPDH 和热休克蛋白 DnaJ 具有直接的相互作用,为进一步研究热休克蛋白 DnaJ 在非经典分泌蛋白 GAPDH 的分泌及其毒力中所发挥的作用奠定了实验基础。

参考文献:

[1] Jedrzejas M J. Pneumococcal virulence factors: structure and function[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2001, 65(2): 187-207.

[2] O'Brien K L, Wolfson L J, Watt J P, *et al*. Burden of disease caused by Streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: global estimates[J]. Lancet, 2009, 374(9693): 893-902.

[3] Jin H, Agarwal S, Agarwal S, *et al*. Surface export of GAPDH/SDH, a glycolytic enzyme, is essential for Streptococcus pyogenes virulence[J]. MBio, 2011, 2(3): e00068-11.

[4] Wang G, Xia Y, Cui J, *et al*. The roles of moonlighting proteins in bacteria[J]. Curr Issues Mol Biol, 2013, 16(1): 15-22.

[5] Boel G, Jin H, Pancholi V. Inhibition of cell surface export of group A streptococcal anchorless surface dehydrogenase affects bacterial adherence and antiphagocytic properties[J]. Infect Immun, 2005, 73(10): 6237-6248.

[6] Terao Y, Yamaguchi M, Hamada S, *et al*. Multifunctional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Streptococcus pyogenes is essential for evasion from neutrophils[J]. J Biol Chem, 2006, 281(20): 14215-14223.

[7] Bergmann S, Rohde M, Hammerschmidt S. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Streptococcus pneumoniae is a surface-displayed plasminogen-binding protein[J]. Infect Immun, 2004, 72(4): 2416-2419.

[8] Attali C, Durmort C, Vernet T, *et al*. The interaction of Streptococcus pneumoniae with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage[J]. Infect Immun, 2008, 76(11): 5350-5356.

[9] Terrasse R, Tacnet-Delorme P, Moriscot C, *et al*. Human and pneumococcal cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins are both ligands of human C1q protein[J]. J Biol Chem, 2012, 287(51): 42620-42633.

[10] Jin H, Song Y P, Boel G, *et al*. Group A streptococcal surface GAPDH, SDH, recognizes uPAR/CD87 as its receptor on the human pharyngeal cell and mediates bacterial adherence to host cells[J]. J Mol Biol, 2005, 350(1): 27-41.

[11] Agarwal V, Kuchipudi A, Fulde M, *et al*. Streptococcus pneumoniae endopeptidase O (PepO) is a multifunctional plasminogen- and fibronectin-binding protein, facilitating evasion of innate immunity and invasion of host cells[J]. J Biol Chem, 2013, 288(10): 6849-6863.

[12] Price K E, Greene N G, Camilli A. Export requirements of pneumolysin in Streptococcus pneumoniae[J]. J Bacteriol, 2012, 194(14): 3651-3660.

[13] Schneewind O, Missiakas D M. Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2012, 367(1592): 1123-1139.

[14] Chatzi K E, Sardis M F, Karamanou S, *et al*. Breaking on through to the other side: protein export through the bacterial Sec system[J]. Biochem J, 2013, 449(1): 25-37.

[15] Cai Y, Yan W, Xu W, *et al*. Screening and identification of DnaJ interaction proteins in Streptococcus pneumoniae[J]. Curr Microbiol, 2013, 67(6): 732-741.

[16] 王哲, 王建敏, 马峰, 等. 肺炎链球菌SpxB蛋白的细胞表达定位、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.

[17] 蔡莺莺. 肺炎链球菌热休克蛋白DnaJ相互作用蛋白的筛选及鉴定[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2013.

[18] 龚燕华, 彭小忠. 蛋白质相互作用及亚细胞定位原理与技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2010: 35-71.

(**收稿**:2014-11-17;**修回**:2015-01-15)

(编辑 邓强庭)