

## 研究报告

胸膜肺炎放线杆菌三聚体自转运黏附素茎部功能区表达  
及其与猪肺组织结合蛋白的筛选分析

鲍春彤 计群 刘建方 朱日宁 雷连成\*

(吉林大学动物医学学院 吉林 长春 130062)

**摘要:**【目的】胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)可引发猪的传染性胸膜肺炎,给世界养猪业造成了巨大损失。黏附是APP在致病过程中的第一步,新型黏附分子——三聚体自转运黏附素(Trimeric autotransporter adhesin, TAA)是该菌感染肺组织的重要毒力因子,茎部区2 464–2 574氨基酸(BD3)序列区域在细菌的黏附中发挥重要作用,但其如何结合肺脏组织尚属未知。本文表达TAA的茎部功能区,筛选其在肺组织中的结合蛋白。【方法】原核表达及纯化TAA功能区BD3蛋白,与猪肺组织共孵育,通过免疫共沉淀技术捕获BD3的结合蛋白并质谱鉴定。构建猪cDNA文库获取该蛋白核酸序列,进行生物信息学分析。【结果】经质谱分析获得与BD3结合的猪肺组织蛋白的肽段,数据库搜寻比对发现角蛋白1为TAA BD3区与猪肺组织结合的蛋白;构建cDNA文库筛选并测序后获知其基因序列。生物信息学分析显示该序列与猪源及人源角蛋白核酸序列相似性低,猪源细胞角蛋白1作为一个单独的进化分支,与其他角蛋白差异较大;该蛋白在8–100 aa处有一个跨膜区;主要二级结构元件为 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 折叠;该蛋白在82–362 aa处存在一个G蛋白 $\alpha$ 亚单位,在515–552 aa处存在一个TSP1区域(凝血酶敏感蛋白1型重复区域)。【结论】与TAA茎部BD3结合的猪肺组织角蛋白1的发现,为TAA黏附肺组织细胞的研究奠定基础,有助于揭示APP嗜肺组织的致病机制。

**关键词:** 胸膜肺炎放线杆菌, 三聚体自转运黏附素, 结合蛋白

**Functional region expression and its binding protein analysis of trimeric autotransporter adhesin in *Actinobacillus pleuropneumoniae***

BAO Chun-Tong JI Qun LIU Jian-Fang ZHU Ri-Ning LEI Lian-Cheng\*

(College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun, Jilin 130062, China)

**Abstract:** [Objective] *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) causes porcine pleuropneumonia, leading to great losses for the pig industry worldwide. Adhesion is the first step in the pathogenic process of APP. The newly discovered trimeric autotransporter adhesin (TAA) is an important

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31520103917)

\*Corresponding author: Tel: 86-431-87836159; E-mail: leiliancheng@163.com

Received: June 22, 2017; Accepted: October 26, 2017; Published online (www.cnki.net): November 15, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31520103917)

\*通讯作者: Tel: 86-431-87836159; E-mail: leiliancheng@163.com

收稿日期: 2017-06-22; 接受日期: 2017-10-26; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-11-15

pathogenic virulence factor of APP, and the 2 464 to 2 574 amino acids of TAA stalk region, named BD3, plays an important role in the bacterial adhesion. However, it is still unclear how APP combines with lung tissues. We express the stalk functional region of TAA, screen and analyze its binding protein in swine lung cells. **[Methods]** BD3 protein was expressed in prokaryotic expression system, purified, then incubated with swine lung tissue protein. The binding protein of BD3 was picked out by co-immunoprecipitation and analyzed by mass spectrometry. The cDNA library was constructed to get the sequence of the binding protein and then the bioinformatics method was done. **[Results]** Mass spectrometry analysis revealed that the peptide sequence of the binding protein, and the blast result in the database showed that Keratin 1 was the binding protein. cDNA library was constructed to know the sequence of swine Keratin 1. Bioinformatics analysis showed that low sequence homology of Keratin 1 existed between swine and human and it was a separate evolutionary branch, different from other keratins of swine or human, Keratin 1 had a transmembrane domain at 8 to 100 aa and the secondary structure mainly consisted of  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -fold. It contained  $\alpha$  subunit of G protein at 82 to 362 aa and a TSP1 domain (thrombin-sensitive protein type I repeat domain) at 515 to 552 aa. **[Conclusion]** The finding of Keratin 1 that is in swine lung cells and binds with BD3 of TAA, lays a foundation for researching the mechanism of TAA adhesion to lung tissue, and has great significance to understand the pathogenic mechanism of APP specially colonized in lung tissues.

**Keywords:** *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Trimeric autotransporter adhesion, Binding protein

猪传染性胸膜肺炎是由胸膜肺炎放线杆菌引起的一种高度致死性、传染性呼吸道疾病, 主要引起以纤维素性和出血性坏死性为特征的胸膜炎、肺炎, 给世界养猪业造成了巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。胸膜肺炎放线杆菌感染宿主时, 黏附是其侵袭宿主的第一步, 因此黏附素成为研究细菌致病机制的重要突破口之一。

三聚体自转运黏附素(TAA)是由革兰氏阴性菌分泌产生的具有黏附作用的蛋白, 不仅介导细菌间的相互作用, 导致细菌自凝及生物被膜的形成, 更在细菌对宿主细胞或组织的黏附过程中起重要作用<sup>[2]</sup>。TAA的C端为跨膜的锚定结构域, N端为承载区。承载区由具有黏附功能的头部结构域和起连接不同结构域作用的颈部区及序列重复的茎部区域构成。其中茎部区域将头部功能区展示在细菌表面, 由于茎部是一段连接头部的、具有高度氨基酸重复序列的结构域, 并且茎部的重复结构使TAA蛋白的整体结构较长, 因此茎部在TAA发挥黏附作用时起到了重要的作用<sup>[3]</sup>。

实验室前期研究发现, TAA茎部的BD3对肺脏上皮细胞具有黏附作用<sup>[4]</sup>。在此基础上, 本实验原核表达并纯化了TAA茎部具有黏附功能的BD3

蛋白, 将其作为诱饵蛋白, 通过免疫共沉淀的方法捕获了与其结合的猪肺组织蛋白, 经质谱分析和比对找出结合蛋白的种类。但因其基因序列未知, 因此通过构建cDNA文库的方法获取含该基因序列的阳性克隆, 测序后获得该结合蛋白的核苷酸序列并对其进行生物信息学分析, 对于全面了解TAA在黏附宿主细胞过程中的机制具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株、实验动物

pGEX-4T-1载体购自Pharmacia公司; pMD18-T购自TaKaRa公司。大肠杆菌DH5 $\alpha$ 和Rosetta(DE3)表达菌株由本实验室保存于-80℃。

45日龄长白猪(军牧一号)仔猪, 购买于吉林大学种猪场。

### 1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶Sal I和EcoR I、基因序列扩增材料ExTaq、dNTPs、IPTG、X-gal、Amp等购自TaKaRa公司; DNA Marker购自天根公司; 胰蛋白酶、酵母提取物购自OXOID公司; Glutathione Sepharose 4B蛋白纯化柱和Time Saver cDNA Synthesis Kit试剂盒购自GE Healthcare公司; Protein

G Agarose 购自碧云天公司; AxyPrep Plasmid Miniprep Kit 质粒提取试剂盒购自长春维特洁生化产品经销部; TRIZOL 试剂购自 Invitrogen 公司, 兔抗 GST-BD3 蛋白多克隆抗体由本实验保存。

PHS-4CT 精密酸度计, 上海大中分析仪器厂; 高速台式离心机, SORVALLPico 公司; Fluor-chem SP (8900)凝胶成像分析系统, Alpha Innotech 公司; 超声波细胞粉碎机 JY92-2D, 宁波新芝科技研究所; PCR 仪、核酸蛋白测定仪, Bio-Rad 公司; SDS-聚丙烯酰胺电泳垂直电泳槽和紫外分光光度计, UNIC 公司。

### 1.3 BD3 菌株的鉴定

以本实验室保存的含 BD3 基因的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株<sup>[4]</sup>为模板, 利用特异性引物(BD3-F: 5'-CGGAATTCGCAAGCAATACCGTCAG-3'; BD3-R: 5'-GCGTCGACTTATAAGCCGATTTGAAGTG-3')对 BD3 基因进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 10 $\times$ ExTaq buffer 2.5  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, 上、下游引物(100  $\mu$ mol/L)各 0.2  $\mu$ L, BD3 菌株 1.5  $\mu$ L, ExTaq 酶(5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 18.4  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 1 min, 48  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。取 5  $\mu$ L PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后, 观察条带大小以评价目的基因扩增效果。

将 Rosetta(DE3)菌株活化后以 1%转接到 5 mL 含氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基<sup>[4]</sup>中, 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 培养过夜, 按照 AxyPrep Plasmid Miniprep Kit 说明书提取质粒。对提取的质粒进行 *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切鉴定, 取 5  $\mu$ L 酶切反应液与相对应的质粒做 1%琼脂糖凝胶电泳分析。

### 1.4 蛋白表达与纯化

对 GST-BD3 融合蛋白进行原核表达及亲和层析纯化, 具体实验操作参见文献[5]。

### 1.5 猪肺组织全蛋白的提取

取出仔猪肺脏, 用预冷的 PBS 溶液洗涤肺脏表面血液与黏液, 立即用无菌镊子与剪刀剪碎肺组织置于 50 mL 离心管内, 用组织匀浆器在冰水浴中

研磨组织直至呈匀浆状态。4  $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 10 min 弃上清, 获取匀浆后分散组织。向烧杯中加入分散组织和细胞组织快速裂解液 Radio immunoprecipitation assay (RIPA), 于冰水混合条件下超声破碎, 超声功率为 100 W, 超声条件为超 5 s 停 15 s。每超声 30 min 后添加苯甲基磺酰氟 (PMSF), 直至细胞悬液呈均一状态。将超声完成后的组织悬液于 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 小心吸取上清转移至新的预冷 EP 管内, 分装后 -20  $^{\circ}$ C 保存备用。将获得的蛋白经 SDS-PAGE 检测提取量。

### 1.6 免疫共沉淀筛选结合蛋白

在预冷的 5 个平行 1.5 mL EP 管中分别加入不同样品(表 1), 其浓度分别为: 组织蛋白 2.5 mg、多抗 2  $\mu$ g。将各组平行样品置于冰水混合浴中, 4  $^{\circ}$ C、175 r/min 孵育过夜。孵育后样品在 4  $^{\circ}$ C、2 500 r/min 离心 2 min, 小心吸除上清(注意, 可留下少量上清, 但不能吸出 Protein G agarose)。使用预冷的 PBS 1 mL/次洗涤沉淀 5 次后去除上清, 加入 20-40  $\mu$ L 的 1 $\times$ SDS-PAGE 电泳上样缓冲液进行电泳<sup>[6]</sup>。

### 1.7 蛋白质质谱分析

对 SDS-PAGE 电泳获得的疑似条带进行观察, 并小心截取目的条带后送至上海博苑生物科技有限公司进行 ABI 4800 Plus MALDI TOF/TOF 基质辅助激光解离飞行时间质谱分析。该质谱主要测定蛋白质的肽质量指纹图谱(PMF)、源后裂解(PSD)碎片离子图谱, 通过结合质谱网络数据库检索获取蛋白序列。

Component	1	2	3	4	5
Tissue protein	+	+	-	-	-
GST-BD3	+	+	+	-	-
Polyclonal antibody	+	-	-	-	+
GST	-	-	-	+	+
Protein G agarose	+	+	-	+	+

Note: +: Added; -: Not added.

## 1.8 文库的构建及筛选

APP 5b 血清型具有较为完整的茎部结构, 并且毒力较强<sup>[7]</sup>, 本实验以 APP 5b 血清型感染后的仔猪肺脏 mRNA 为模板, 参照文献[8]经反转录 PCR 合成 cDNA, 与 pMD18-T 载体连接后转化入 *E. coli* DH5 $\alpha$  受体菌, 获得阳性克隆, 得到组织细胞的 cDNA 文库。

## 1.9 结合蛋白编码基因的克隆与分析

通过质谱获得的肽段序列与该蛋白家族的保守区比较, 选择关键保守序列, 推导该序列的氨基酸序列设计引物。上游引物: 5'-AAGTCACTCAACAACCA-3'; 下游引物: 5'-GTCAATGAAGGAGGCAAA-3', 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以获得的 cDNA 文库菌株为模板, 筛选阳性克隆菌株。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 10 $\times$ ExTaq buffer 2.5  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, 上、下游引物 (100  $\mu$ mol/L) 各 0.2  $\mu$ L, cDNA 文库菌株 1.5  $\mu$ L, ExTaq 酶(5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 18.4  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 10 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 48  $^{\circ}$ C 40 s, 72  $^{\circ}$ C 40 s, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。将 PCR 鉴定为阳性的菌株在 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 恒温培养 18 h, 保存甘油菌, 送北京华大基因生物公司进行序列测定, 获取目的序列。

## 1.10 生物信息学分析软件

使用生物软件 DNASTar 中 MegAlign 功能, ClustalW 方法分析核苷酸同源性。DNASTar 中的 MegAlign 功能绘制 CK1sw 进化树。根据 ExPASy 数据库及在线分析功能, 提交 CK1sw 蛋白序列, 预测获得蛋白基本信息: 等电点、分子量、氨基酸组成和不稳定系数等数据结果; 使用 DNASTar 的 Protean 功能分析序列的疏水性, 与在线分析结果比较。CBS 的 TMHMM 在线预测软件分析 CK1sw 蛋白是否存在跨膜区, 使用 GOR 进行在线二级结构预测, MyHits 进行蛋白质轮廓序列分析。Smart 和 ExPASy 在线分析软件预测该蛋白的结构功能域。

## 2 结果与分析

### 2.1 TAA 功能区的表达、纯化

以本实验室前期构建的含 BD3 基因的大肠杆菌菌株为模板, 经 PCR 扩增获得大小在 300 bp 左右的 BD3 目的基因片段, 符合预期结果(图 1)。活化后的 Rosetta(DE3) 菌株在终浓度 0.8 mmol/L IPTG、25  $^{\circ}$ C 低温诱导 6 h 的最佳表达条件下原核表达后经 Glutathione Sepharose 4B 纯化柱亲和层析纯化, 在 39 kD 处出现与预期大小一致的目的条带(图 2), 说明已成功纯化出目的蛋白 BD3。

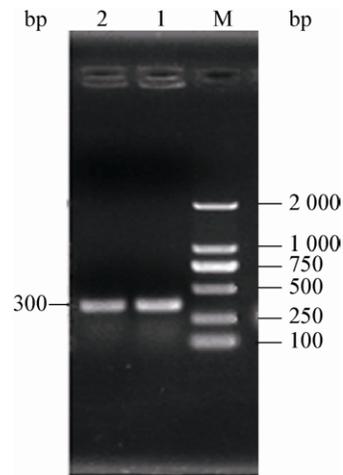


图 1 BD3 PCR 鉴定图

Figure 1 Analysis of BD3 PCR

注: 1、2: BD3 的 PCR 产物; M: DL2000 marker.

Note: 1, 2: PCR product of BD3; M: DL2000 marker.

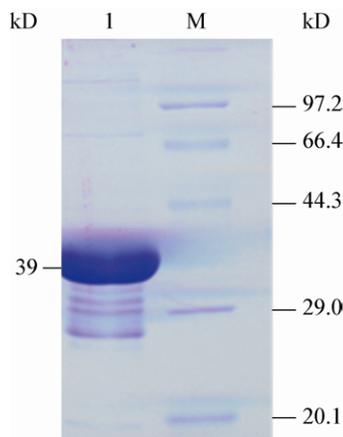


图 2 SDS-PAGE 检测 GST-BD3 蛋白纯化电泳图

Figure 2 SDS-PAGE analysis protein purification of GST-BD3

注: 1: 纯化后 GST-BD3 蛋白; M: 低分子量蛋白 Marker.

Note: Purified GST-BD3 protein; M: Low molecular weight protein marker.

## 2.2 与 TAA 功能区结合的肺组织蛋白的筛选

为了便于肺组织结合蛋白的筛选, 首先利用纯化的 BD3 蛋白制备了兔多克隆抗体, 并通过免疫共沉淀的方法获得了 BD3 的结合蛋白(图 3), 对泳道 1 分析结果显示, 该泳道除了出现正常结合的抗体重链、轻链及 GST-BD3 诱饵蛋白链, 在 66 kD 处出现清晰可见条带, 该条带除了可能存在于组织蛋白外, 不存在于其他成分, 因此可能作为与 GST-BD3 的结合蛋白。将获得的条带切下后经质谱分析, 分析后获得的肽段序列经数据库搜寻比对后, 网页检索结果显示, Keratin 1 为 BD3 可能的结合蛋白(图 4)。

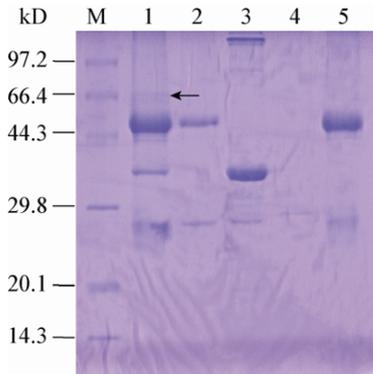


图 3 SDS-PAGE 检测蛋白互作结果

Figure 3 SDS-PAGE analysis protein interaction

注: 1: 添加特异性兔多克隆抗体的免疫共沉淀反应; 2: 没有添加抗体的免疫共沉淀反应; 3: 纯化后的 GST-BD3 蛋白; 4、5: 对照组。

Note: 1: Immunoprecipitation with adding rabbit specific polyclonal antibodies; 2: Immunoprecipitation without adding rabbit specific polyclonal antibodies; 3: Purified GST-BD3 protein; 4, 5: Control group.

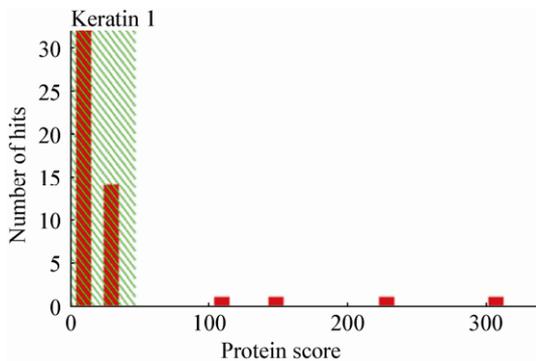


图 4 网页检索结果

Figure 4 Results of Mascot search

## 2.3 猪肺组织结合蛋白的筛选分析

### 2.3.1 肺组织全蛋白 cDNA 文库的构建:

角蛋白 1 在细菌 TAA 黏附宿主细胞的过程中起着重要的作用, 但猪源角蛋白研究较少, 已公布序列为基因软件预测, 存在一定误差, 于是我们构建猪肺组织 cDNA 文库, 通过特定探针引物筛选方法获得该蛋白基因序列, 并根据基因序列对其进行结构分析。首先, 提取了肺组织总 RNA, 利用特异性引物构建了 cDNA 文库。将质谱获得的肽段序列与该蛋白家族的保守区比较, 选择关键保守序列, 通过推导该序列的氨基酸序列设计引物, 用该引物验证 cDNA 文库中的重组片段, 取阳性克隆测序, 获取目的序列。

提取后的 RNA 用 RNase-free H<sub>2</sub>O 稀释 50 倍后测定浓度及纯度, 结果显示含量为 86.6 μg/mL, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值为 1.91; OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 值为 2.34。说明该 RNA 中蛋白、核酸污染程度低, 完整性好, 同时也满足浓度要求, 可以用于下一步 cDNA 文库构建。本实验中用于 cDNA 第一链合成的 RNA 含量约为 5 μg, 显示洗脱柱最佳添加体积为 10 μL/5 μg RNA。将获得的 cDNA 洗脱液均重组转化到大肠杆菌 DH5α 后, 最终获得 513 株重组菌株。对获得的部分菌株使用探针引物 PCR 鉴定, 72 个菌株中有 45 个在 200 bp 处出现阳性条带。将对应的阳性菌株交由北京华大基因生物公司进行测序, 获得该结合蛋白的基因序列。

### 2.3.2 肺组织中结合蛋白的结构分析:

对获得的结合蛋白的核苷酸序列进行种间、种内同源性和遗传进化树分析(图 5-8)。结果显示种内核苷酸一致性在 31.5%–39.2% 之间, 其他角蛋白一致性在 42.4%–59.9% 之间, 表明同一物种中角蛋白一致性低, 这与角蛋白的组织特异性分布有关, 同时也说明角蛋白家族具有广泛的配体特征。猪源角蛋白 1 与人源角蛋白的一致性在 27.5%–33.1% 之间, 这说明角蛋白在不同种间存在很大差异性, 同时该蛋白在种内同源性高于种间。进化树分析结果显示获得的细胞角蛋白 1 作为一个单独的进化分支, 与其他角蛋白差异较大。

		Percent identity					
		1	2	3	4	5	
Divergence	1	█	33.8	31.8	39.2	31.5	1
	2	166.8	█	44.2	57.6	42.7	2
	3	198.0	103.9	█	42.4	59.9	3
	4	131.9	62.9	110.6	█	43.5	4
	5	202.8	109.5	58.0	105.8	█	5
		1	2	3	4	5	

图 5 CK1sw 与猪角蛋白同源性分析  
Figure 5 Homology analysis of CK1sw with swine keratins

对获得的结合蛋白进行蛋白水平的相关分析,结果显示 CK1sw 由 601 个氨基酸组成,蛋白理论分子量为 68 317.54 Da; 理论等电点(pI)为 9.37。不稳定系数(II)为 49.76,表明该蛋白不稳定。亲水区域主要位于 230-265 aa 和 510-600 aa 处;疏水区域位于 8-140、300-340、480-510 aa 处。结合 Expasy 数据库的分析,显示该蛋白的总

平均亲水性(GRAVY)值为-0.041,说明该蛋白具有一定的亲水性(图 9)。

信号肽一般位于起始密码子后的一段疏水序列,预测结果表明 CK1sw 蛋白并不具有信号肽。这一方面可能与该蛋白本身疏水性弱有关;其次也说明该蛋白靶向胞膜可能需要一些伴侣蛋白辅助其功能的发挥。TMHMM 预测结果显示 CK1sw 在 8-100 aa 处存在一个跨膜区(图 10)。

DNAStar 软件分析结果显示,CK1sw 的二级结构元件以  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠为主,其次为 Turn, Coil 结构最少。其中,  $\alpha$  螺旋主要出现在 120-200 aa 和 300-400 aa 处;  $\beta$  折叠主要出现在 420-500 aa 处, Turn 结构主要出现在 200-280 aa 和 500-600 aa 处(图 11)。这种结构分布决定了 CK1sw 蛋白的高级构象与其功能的发挥密切相关。

		Percent identity																																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33		
Divergence	1	█	29.3	33.1	30.3	31.2	33.1	29.5	32.2	32.7	32.5	31.3	28.9	30.2	32.8	31.3	28.3	31.8	29.1	31.8	28.4	29.7	28.7	27.9	28.4	28.3	28.8	29.3	28.9	30.0	29.0	27.5	28.5	30.6	1	CK1 seq.
	2	248.1	█	38.9	35.8	39.8	39.2	38.3	39.6	39.6	41.0	39.6	63.5	37.5	37.0	36.5	59.7	37.9	33.5	36.3	58.8	34.2	60.1	54.0	53.1	54.0	53.8	56.0	55.7	53.3	51.0	52.8	49.3	38.6	2	10.seq
	3	185.3	127.7	█	53.3	54.8	55.6	51.8	55.4	57.1	49.4	56.3	37.4	47.7	55.5	56.0	39.5	50.8	41.7	47.3	39.0	45.3	39.5	40.0	36.1	37.1	35.8	38.3	38.5	40.3	38.0	39.3	37.3	56.7	3	12.seq
	4	283.7	146.9	74.6	█	53.8	56.1	52.7	55.7	57.8	50.2	55.4	38.3	48.0	54.0	52.7	38.1	48.8	44.3	46.1	37.5	45.8	37.3	39.0	37.6	37.2	37.4	36.0	39.0	37.4	38.3	38.1	37.4	48.1	4	13.seq
	5	227.6	122.6	69.6	72.3	█	62.8	72.0	63.4	63.5	52.7	63.0	39.9	50.2	52.3	50.7	41.3	54.5	48.6	47.7	41.4	48.1	40.7	41.6	40.6	40.2	40.7	41.8	41.2	42.3	43.5	41.6	41.9	50.2	5	14.seq
	6	184.3	126.5	67.7	66.6	51.5	█	62.5	83.2	80.2	52.2	63.1	39.5	51.2	53.7	52.4	41.1	56.5	50.9	49.9	41.8	50.9	41.5	43.0	41.0	41.6	40.6	40.0	40.7	43.1	43.2	41.2	42.7	53.5	6	15.seq
	7	350.0	129.8	77.7	75.0	35.3	52.1	█	61.3	62.8	51.3	61.9	38.2	51.6	51.6	50.3	39.9	54.8	48.0	48.2	39.2	48.0	39.2	40.4	39.4	39.4	39.2	39.4	39.3	40.0	41.4	38.6	41.0	49.0	7	16.seq
	8	207.4	122.9	68.1	67.9	50.4	19.1	54.7	█	72.6	50.7	62.4	38.8	51.4	54.6	51.8	40.9	57.0	49.4	50.3	42.3	48.8	41.3	42.3	40.8	41.0	40.6	39.8	40.1	42.7	43.0	42.2	43.0	51.4	8	17.seq
	9	206.6	123.1	64.2	62.7	50.4	23.1	51.7	34.3	█	55.5	65.9	40.8	53.3	56.3	53.4	42.1	59.6	52.2	51.6	42.7	53.5	41.8	42.4	42.3	41.5	41.4	41.5	41.2	43.1	44.4	42.2	44.9	52.1	9	18.seq
	10	193.5	116.8	86.3	82.3	74.9	76.6	78.9	81.0	67.6	█	53.3	41.5	48.8	50.0	48.0	42.3	51.3	48.2	46.8	41.7	47.6	43.5	42.8	41.3	42.9	41.8	42.3	41.9	44.1	43.0	42.0	42.2	48.6	10	19.seq
	11	247.7	123.7	66.1	68.3	51.3	51.0	53.5	52.6	45.8	73.3	█	40.4	53.0	55.2	52.7	40.9	58.8	51.0	49.2	41.3	51.0	43.4	42.7	41.8	41.3	42.3	42.7	41.2	43.4	44.9	42.6	43.8	53.0	11	20.seq
	12	276.9	50.5	137.5	130.3	121.5	123.8	130.4	127.5	117.1	114.8	118.8	█	37.5	36.8	35.6	60.6	38.8	35.7	36.9	58.2	36.2	58.3	53.9	52.4	54.8	51.8	56.3	55.1	53.3	51.0	50.9	49.8	37.4	12	21.seq
	13	221.8	135.6	92.3	90.5	82.3	80.4	78.3	79.4	74.2	86.9	74.5	136.6	█	49.0	47.6	37.2	46.6	42.8	45.0	34.7	45.4	36.6	38.8	35.5	37.4	36.8	35.4	37.2	38.3	36.7	37.7	37.3	45.0	13	22.seq
	14	199.9	139.4	69.7	72.9	76.0	72.6	77.9	70.6	65.9	83.3	69.1	140.4	85.4	█	68.8	36.4	47.2	45.3	45.8	37.4	48.2	38.3	38.7	36.0	36.6	36.1	38.6	37.1	39.1	38.1	38.1	37.7	51.0	14	23.seq
	15	234.6	143.3	68.1	76.6	80.8	76.6	82.3	78.9	74.2	90.0	76.9	149.0	91.3	41.2	█	35.7	45.9	43.1	43.6	37.9	44.7	37.5	36.6	35.4	35.6	36.9	36.7	36.3	36.4	36.9	39.1	36.8	48.9	15	24.seq
	16	350.0	58.8	123.9	130.8	114.7	115.6	121.3	116.6	111.1	111.4	116.4	57.0	139.9	142.1	149.7	█	38.9	35.7	36.9	58.8	34.8	60.1	57.7	56.9	57.2	54.7	56.4	57.1	54.5	52.4	53.6	51.7	38.4	16	25.seq
	17	197.0	132.7	80.3	87.1	70.2	65.0	69.3	64.0	58.1	78.8	59.9	127.7	94.9	92.0	96.6	126.8	█	61.1	60.5	39.7	59.2	39.8	42.1	40.2	41.0	39.3	39.3	40.4	43.4	43.0	41.3	41.5	45.7	17	26.seq
	18	243.4	164.0	113.8	102.1	86.9	79.9	88.6	84.6	76.1	88.1	79.6	146.9	109.0	98.6	107.7	146.9	55.3	█	57.5	37.2	55.7	36.4	40.8	36.1	37.0	35.2	37.7	37.5	39.2	39.8	35.9	38.0	38.6	18	27.seq
	19	197.6	144.7	92.7	97.4	91.4	83.9	88.9	82.8	79.0	93.6	87.1	141.5	101.1	97.7	106.6	139.6	65.5	64.2	█	38.4	56.6	36.4	37.6	37.6	37.9	38.0	37.4	37.4	38.6	39.5	38.1	38.6	42.0	19	28.seq
	20	286.4	60.2	126.7	134.7	114.2	112.1	124.8	109.9	108.5	113.0	114.3	61.7	156.5	135.1	132.4	60.9	122.8	137.2	130.3	█	35.7	59.4	58.3	55.7	58.1	56.6	58.3	56.9	55.1	50.9	52.2	49.4	36.5	20	29.seq
	21	242.0	160.1	99.3	97.2	89.3	80.3	89.5	87.4	73.1	90.9	80.7	143.2	99.9	88.6	101.7	155.2	59.4	67.7	65.8	146.9	█	37.1	38.9	36.4	36.9	36.4	37.0	38.4	38.6	38.5	36.4	38.2	41.6	21	30.seq
	22	323.7	57.5	125.0	137.3	118.1	114.0	125.9	115.3	112.5	105.4	105.9	61.7	141.9	130.5	136.2	57.5	121.6	141.3	144.1	58.9	138.1	█	61.1	54.8	57.1	55.5	69.0	57.4	56.8	54.9	55.6	51.8	37.5	22	31.seq
	23	370.3	71.8	122.2	126.8	113.1	107.1	118.9	109.9	109.5	107.9	108.4	72.2	127.8	129.1	141.0	62.5	110.9	116.8	134.5	61.3	126.7	55.0	█	58.0	59.8	57.1	60.7	56.5	65.0	54.7	57.0	54.8	36.8	23	32.seq
	24	350.0	74.2	146.6	134.4	117.9	115.9	123.0	117.1	110.2	114.8	112.1	76.2	150.0	144.0	150.1	64.4	119.7	143.6	135.5	67.3	143.9	69.5	61.7	█	71.5	67.0	54.5	59.6	56.0	51.9	52.1	50.5	36.1	24	33.seq
	25	318.6	72.0	138.8	138.1	119.9	113.1	123.7	115.9	113.4	107.5	115.0	70.2	136.7	141.7	147.8	63.9	116.2	137.8	132.7	61.8	138.7	63.9	57.8	36.2	█	67.5	57.8	57.2	53.3	53.5	52.3	36.1	25	34.seq	
	26	339.6	72.3	148.3	135.8	117.4	117.7	124.8	118.2	114.5	112.4	110.3	78.0	140.9	145.4	139.9	70.3	124.9	149.9	133.4	65.3	144.7	67.8	63.9	43.8	43.2	█	54.2	57.8	54.3	51.1	52.0	49.9	35.9	26	35.seq
	27	249.2	67.3	133.6	147.2	112.9	121.0	124.4	122.3	114.2	110.0	108.7	66.4	150.7	129.0	140.3	66.3	124.5	133.4	136.2	61.2	137.7	40.3	55.7	70.3	63.6	71.1	█	56.2	55.5	52.6	54.2	50.6	35.6	27	36.seq
	28	249.7	67.5	129.5	126.8	114.9	117.3	124.2	120.5	115.0	111.8	114.8	69.1	137.0	137.3	143.0	64.2	118.6	134.3	135.1	64.6	129.4	63.1	65.1	58.6	60.3	62.9	66.2	█	55.0	52.5	51.8	52.7	37.1	28	37.seq
	29	220.0	73.8	120.8	137.6	110.0	106.6	120.8	108.2	106.6	102.6	105.6	73.9	130.5	125.8	144.2	70.7	105.4	125.2	129.9	68.9	128.8	64.6	47.5	66.5	63.7	71.1	68.0	69.0	█	56.3	55.2	54.9	37.0	29	38.seq
	30	360.3	80.4	134.8	131.7	105.1	106.5	114.6	107.2	101.8	107.6	99.5	79.5	141.1	131.7	141.8	75.9	108.1	121.6	124.9	80.1	128.9	69.0	69.5	76.9	73.2	79.3	75.2	75.2	65.7	█	62.3	80.7	35.4	30	39.seq
	31	350.0	74.9	126.6	133.2	113.3	116.1	128.3	111.3	110.9	113.1	109.5	80.2	134.2	133.7	127.6	72.3	115.1	144.8	131.2	76.6	143.2	67.4	64.1	76.6	73.0	77.0	71.1								

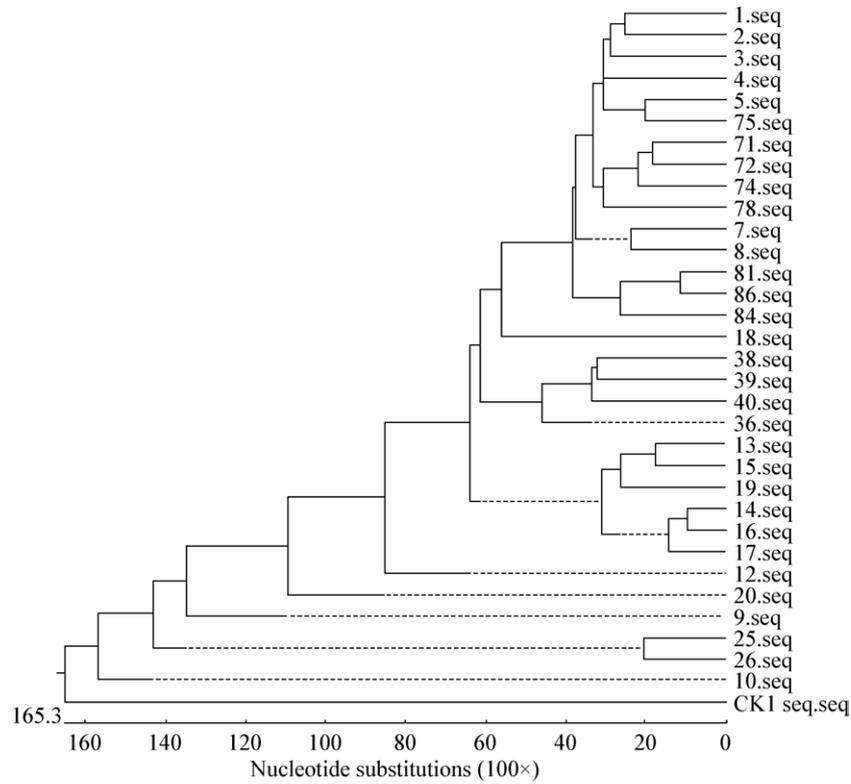


图 8 CK1sw 与人角蛋白进化树分析

Figure 8 Phylogenetic tree of CK1sw with human keratins

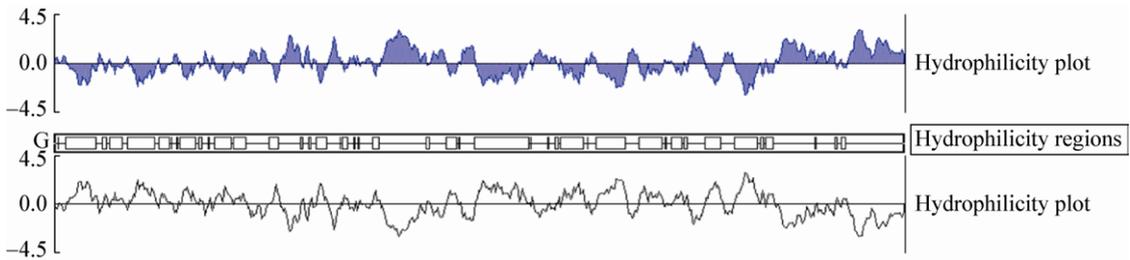


图 9 CK1sw 疏水性预测

Figure 9 Hydrophobic prediction of CK1sw

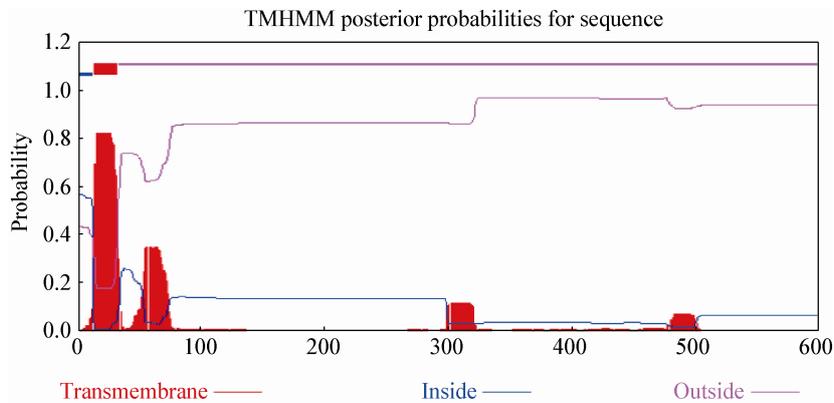


图 10 CK1sw 跨膜区预测

Figure 10 Transmembrane prediction of CK1sw

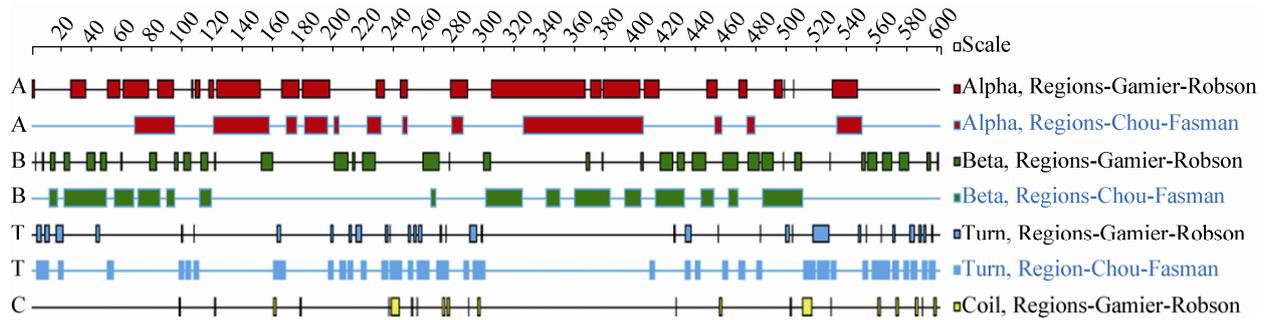


图 11 CK1sw 二级结构原件预测

Figure 11 Secondary structural elements prediction of CK1sw

Motif Scan 轮廓分析结果显示, 编码 CK1sw 序列的氨基酸中, 主要包括一个 N-糖基化位点、一个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点和一个蛋白激酶 C 磷酸化位点。其中, 蛋白激酶 C 和酪蛋白激酶 II 磷酸化位点主要集中在 100–200 aa 及 300 aa 附近。经 SMART 在线分析后, 获得 CK1sw 的蛋白结构功能区。结果显示, 该蛋白的跨膜区位于 13–32 aa 处, 序列为 FFFFFGSGIVCNVFTETHL; 在 17–76 aa 处有一个细胞核激素受体 c4 锌指结构, 该结构与细胞分化和内稳态等多种生理功能有关; 28–89 aa 处存在一个 DDT 区域, 该区域被认为是 DNA 结合区域; 82–362 aa 处存在一个 G 蛋白(鸟嘌呤核苷酸结合蛋白)  $\alpha$  亚单位, 该亚单位能与  $\beta$ 、 $\gamma$  亚单位结合形成异源三聚体的 G 蛋白, G 蛋白同 G 蛋白偶联受体(GPCRs)形成哺乳动物中最常见的信号系统; 280–391 aa 处存在一个具有细菌转录激活因子作用的 BTAD 区域; 在 515–552 aa 处的 TSP1 区域(凝血酶敏感蛋白 1 型重复区域)能够结合并活化 TGF- $\beta$ , 凝血酶敏感蛋白是一种多聚化的多重区域糖蛋白, 在细胞表面和胞外基质环境中发挥作用, 并且与补体途径、细胞间结合、抑制凋亡有关。

### 3 讨论

TAA 是革兰氏阴性菌表面的一类庞大的蛋白家族, 在多种细菌表面存在, 并且在细菌的自凝、生物被膜形成、黏附、侵袭及致病过程中发挥着举足轻重的作用。Hia 可以介导流感嗜血杆菌对呼吸道上皮细胞的黏附<sup>[9]</sup>; 洋葱伯克霍尔德杆菌

TAA 可以直接与呼吸道上皮和肺细胞表面受体结合, 形成“纳米弹簧”样结构, 促进细菌黏附细胞和定殖<sup>[10]</sup>; Usp A1 可以通过茎部结构域与人 CEACAM1 受体结合, 促进卡他莫拉菌的侵袭作用<sup>[11–12]</sup>。布鲁氏菌中发现的 TAA、BtaE 参与了布鲁氏菌与透明质酸的结合, 并可黏附到 HeLa 细胞和人肺泡上皮细胞系 A549<sup>[13]</sup>。最近发现细胞表面的多种受体参与与 TAA 的相互作用中, 如 Nad A 可以通过与  $\beta$ 1-整合素和热休克蛋白 90 (Hsp90)作用, 促进脑膜炎奈瑟氏菌侵袭宿主细胞<sup>[14–16]</sup>。TAA 蛋白家族除了其保守的 C 端锚定区域外, 其茎部序列复杂且多样<sup>[2]</sup>, 黏附素受体也存在多样性的特点, 为黏附素受体的研究带来很大困难。TAA 除了具有多样性的特点外, 还具有宿主专一性的特征<sup>[3]</sup>, 因此, 研究其与特异性宿主的受体相结合成为该蛋白研究的主要突破点。

本课题组前期研究已经证实, BD3 参与 APP 对细胞的黏附作用, 并且作用效果极其明显<sup>[4]</sup>。在研究 TAA 与宿主细胞结合时, 多数研究认为其头部及茎部末端是其结合的主要部位。本研究中的 BD3 基因位于 TAA 的 2 464–2 574 aa 部位, 是茎部的中后区域, 这为研究 TAA 与受体结合部位提供了新的补充。

为获得猪肺组织蛋白中与胸膜炎放线杆菌 TAA 结合的蛋白, 本研究原核表达并纯化了 TAA 茎部功能区 GST-BD3 蛋白, 提取猪肺组织全蛋白后通过免疫共沉淀的方法筛选出了能与 BD3 发生

结合的结合蛋白; 通过对该蛋白的质谱分析及数据库搜寻获知该蛋白种类为细胞角蛋白 1, 该蛋白在结合过程中发挥作用的关键部位大多数是某些特定的氨基酸基序。角蛋白 1 在与人相关的疾病中研究较多, 尤其在癌症过程中会发生明显变化<sup>[17]</sup>。这类疾病在哺乳动物猪中并不常见, 所以关于猪源的角蛋白 1 研究相对较少。据分析, 猪的角蛋白 1 中大约存在 9 个外显子, 使得推测序列显示出很大的不可靠性。因此, 构建含有该蛋白的 cDNA 文库对于下一步研究其与 TAA 的结合具有重要意义。通过将质谱肽段序列与角蛋白保守区比较, 以共有序列为基础设计核酸探针引物, 能够有效获得含有目的基因的序列。本实验成功从猪肺组织中提取出符合构建 cDNA 文库标准的 RNA, 合成 cDNA 经纯化后插入连接子, 与载体连接并转入大肠杆菌, 扩增获得 cDNA 文库。对文库利用特异性引物进行 PCR 检测, 并将阳性菌株测序以获得猪源细胞角蛋白 1 的基因序列。

使用生物信息学技术, 利用计算机数据库和建立的程序算法分析目的蛋白质、基因, 获取其结构与功能、致病机制及进化信息, 为实验结果提供客观参考及预测。本实验以测序获得的基因序列为基础, 参考数据库中已有资源, 通过生物信息学角度拟合, 分析细胞角蛋白与 TAA 结合, 为结合蛋白鉴定及研究提供依据。

细胞角蛋白(Cytokeratin, CK)是细胞骨架蛋白中间丝蛋白家族成员<sup>[18]</sup>, 该家族大约包括 20 个分子量在 40–60 kD 之间的蛋白。细胞角蛋白一般成对出现, 形成异源二聚体、四聚体, 然后再形成原纤维丝和中间纤维丝, 从而具备维持细胞力学完整性及调节细胞周期的作用<sup>[19]</sup>。细胞角蛋白作为黏附素的特异性受体, 在研究肺炎球菌黏附素时认为 CK4 作为丝氨酸重复序列(SRRP)中 NR 的结合配体<sup>[20]</sup>, CK10 与 BR 发生特异性结合<sup>[21]</sup>, 这些研究表明 CK 结合受体存在多样性。本研究中 BD3 主要基序为 IsNeck 和其后的 Trp-ring。研究结果显示 CK 蛋白能够与多种基序结合, 这是由于 CK 蛋白

家族本身具有多样性, 同时蛋白本身结构复杂。

目前发现细胞角蛋白 1 与多种疾病有关, 癌症<sup>[17,22]</sup>和皮肤类疾病(如银屑病)患者细胞角蛋白 1 高表达<sup>[23]</sup>, 可作为这些疾病的检测指标或治疗靶标; 而在炎症性肠病发生时, 小肠上皮细胞上的角蛋白 1 表达显著降低, 可能在维持上皮屏障的过程中起着重要作用, 并与炎症性肠病的进展相关<sup>[24]</sup>。本研究发现猪肺组织细胞角蛋白 1 是胸膜肺炎放线杆菌三聚体自转运黏附素茎部 BD3 的结合蛋白, 该结合蛋白的发现为进一步研究胸膜肺炎放线杆菌三聚体自转运黏附素与猪肺脏上皮细胞的结合及信号传递过程提供参考, 为三聚体自转运黏附素与肺组织细胞黏附的机制研究奠定基础, 这对于揭示 APP 专嗜肺组织的致病机制具有重要意义。

## 参 考 文 献

- [1] Chiers K, de Waele T, Pasmans F, et al. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host[J]. *Veterinary Research*, 2010, 41(5): 65
- [2] Qin WH, Wang L, Lei LC. New findings on the function and potential applications of the trimeric autotransporter adhesin[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2015, 108(1): 1-14
- [3] Kaiser PO, Linke D, Schwarz H, et al. Analysis of the BadA stalk from *Bartonella henselae* reveals domain-specific and domain-overlapping functions in the host cell infection process[J]. *Cellular Microbiology*, 2012, 14(2): 198-209
- [4] Xiao LW, Zhou L, Sun CJ, et al. Apa is a trimeric autotransporter adhesin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* responsible for autoagglutination and host cell adherence[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2012, 52(5): 598-607
- [5] Wang L, Qin WH, Yang SX, et al. The Adh adhesin domain is required for trimeric autotransporter Apa1-mediated *Actinobacillus pleuropneumoniae* adhesion, autoaggregation, biofilm formation and pathogenicity[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 177(1/2): 175-183
- [6] Wang L. The mechanisms of trimeric autotransporter adhesion Adh in the interaction between *Actinobacillus pleuropneumoniae* and host PAMs[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jilin University, 2015 (in Chinese)  
王磊. 三聚体自转运黏附素 Adh 参与胸膜肺炎放线杆菌与宿主 PAMs 互作的机制研究[D]. 长春: 吉林大学博士学位论文, 2015
- [7] Wang Y. The study of sequence analysis and adhesion activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae*[D]. Shihezi: Master's Thesis of Shihezi University, 2011 (in Chinese)  
王瑜. 胸膜肺炎放线杆菌自转运黏附素序列分析及其黏附活性研究[D]. 石河子: 石河子大学硕士学位论文, 2011

- [8] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning[M]. Translated by Huang PT. Beijing: Science Press, 2002: 889-894 (in Chinese)  
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 889-894
- [9] Laarmann S, Cutter D, Juehne T, et al. The *Haemophilus influenzae* hia autotransporter harbours two adhesive pockets that reside in the passenger domain and recognize the same host cell receptor[J]. Molecular Microbiology, 2002, 46(3): 731-743
- [10] El-Kirat-Chatel S, Mil-Homens D, Beaussart A, et al. Single-molecule atomic force microscopy unravels the binding mechanism of a *Burkholderia cenocepacia* trimeric autotransporter adhesin[J]. Molecular Microbiology, 2013, 89(4): 649-659
- [11] Hill DJ, Edwards AM, Rowe HA, et al. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule: (CEACAM)-binding recombinant polypeptide confers protection against infection by respiratory and urogenital pathogens[J]. Molecular Microbiology, 2005, 55(5): 1515-1527
- [12] Connors R, Hill DJ, Borodina E, et al. The *Moraxella* adhesin UspA1 binds to its human CEACAM1 receptor by a deformable trimeric coiled-coil[J]. The EMBO Journal, 2008, 27(12): 1647-1789
- [13] Ruiz-Ranwez V, Posadas DM, van der Henst C, et al. BtaE, an adhesin that belongs to the trimeric autotransporter family, is required for full virulence and defines a specific adhesive pole of *Brucella suis*[J]. Infection and Immunity, 2013, 81(3): 996-1007
- [14] Cecchini P, Tavano R, de Laureto PP, et al. The soluble recombinant *Neisseria meningitidis* adhesin NadA $\Delta_{351-405}$  stimulates human monocytes by binding to extracellular Hsp90[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25089
- [15] Montanari P, Bozza G, Capocchi B, et al. Human heat shock protein (Hsp) 90 interferes with *Neisseria meningitidis* adhesion A (NadA)-mediated adhesion and invasion[J]. Cellular Microbiology, 2012, 14(3): 368-385
- [16] Bozza G, Capitani M, Montanari P, et al. Role of ARF6, Rab11 and external Hsp90 in the trafficking and recycling of recombinant-soluble *Neisseria meningitidis* adhesin A (rNadA) in human epithelial cells[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110047
- [17] Ratushny V, Gober MD, Hick R, et al. From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2012, 122(2): 464-472
- [18] Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins[J]. The Journal of Cell Biology, 2006, 174(2): 169-174
- [19] Coulombe PA, Wong P. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds[J]. Nature Cell Biology, 2004, 6(8): 699-706
- [20] Samen U, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ, et al. The surface protein Srr-1 of *Streptococcus agalactiae* binds human keratin 4 and promotes adherence to epithelial HEP-2 cells[J]. Infection and Immunity, 2007, 75(11): 5405-5414
- [21] Shivshankar P, Sanchez C, Rose LF, et al. The *Streptococcus pneumoniae* adhesin PsrP binds to Keratin 10 on lung cells[J]. Molecular Microbiology, 2009, 73(4): 663-679
- [22] Soufy R, Etayash H, Bahadorani K, et al. Breast cancer targeting peptide binds keratin 1: a new molecular marker for targeted drug delivery to breast cancer[J]. Molecular Pharmaceutics, 2017, 14(3): 593-604
- [23] Arul S, Dayalan H, Jegadeesan M, et al. Induction of differentiation in psoriatic keratinocytes by propylthiouracil and fructose[J]. BBA Clinical, 2016, 6: 82-86
- [24] Dong XQ, Liu ZC, Lan DF, et al. Critical role of Keratin 1 in maintaining epithelial barrier and correlation of its down-regulation with the progression of inflammatory bowel disease[J]. Gene, 2017, 608: 13-19