

DOI:10.13350/j.cjpb.230510

• 论著 •

# 铜绿假单胞菌丙酸代谢关键酶基因的克隆表达 及生物信息学分析\*

崔国艳<sup>1,2</sup>, 李壮<sup>2</sup>, 崔佳<sup>1</sup>, 刘建玲<sup>2\*\*</sup>

(1. 长治医学院微生物教研室, 山西长治 046000; 2. 西北大学西部资源生物学与生物技术教育部重点实验室)

**【摘要】** **目的** 克隆表达丙酸代谢关键酶基因 *prpB*、*prpC* 和 *prpD*, 分析预测相应表达蛋白潜在的结构和功能, 为铜绿假单胞菌新型抗菌靶点的开发奠定基础。**方法** 对铜绿假单胞菌中丙酸代谢关键基因 *prpB*、*prpC*、*prpD* 克隆入大肠埃希菌, 构建相应的基因工程重组菌, 通过镍柱亲和和层析纯化重组蛋白, SDS-PAGE 检测 PrpB、PrpC 和 PrpD 蛋白的分子质量及纯度。利用生物信息学软件预测 PrpB、PrpC 和 PrpD 蛋白的理化性质、疏水性、信号肽、二级结构和三级结构。

**结果** 重组菌用 0.5 mmol/L IPTG 于 16 °C 条件下诱导, 表达的重组蛋白 PrpB、PrpC 和 PrpD 主要以可溶性形式存在于上清中, 经 Ni 柱亲和和层析纯化得到相对分子质量分别为  $32 \times 10^3$ 、 $42 \times 10^3$ 、 $55 \times 10^3$  的目的蛋白, 与预期一致。生物信息学分析 PrpB、PrpC 和 PrpD 蛋白分别由 298、375、494 个氨基酸组成, 相对分子质量分别为  $32.14 \times 10^3$ 、 $41.69 \times 10^3$ 、 $54.88 \times 10^3$ , 等电点分别为 5.33、6.03、6.15。3 种蛋白均为亲水性蛋白, 无信号肽, 无跨膜结构。蛋白亚细胞定位于细胞质中,  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲是 PrpB、PrpC 和 PrpD 二级结构的主要蛋白质元件。**结论** 成功表达了重组蛋白 PrpB、PrpC 和 PrpD 并进行了纯化。生物信息学预测 PrpB、PrpC 和 PrpD 含有丰富的  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲结构, 为揭示 PrpB、PrpC 和 PrpD 蛋白的结构及丙酸代谢在铜绿假单胞菌中的生物学功能奠定了理论基础。

**【关键词】** 铜绿假单胞菌; 丙酸代谢; 蛋白表达; 生物信息学

**【中图分类号】** R378.99

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)05-0547-05

[Journal of Pathogen Biology. 2023 May;18(5):547-551,556.]

## Cloning, expression and bioinformatic analysis of propionate metabolism key enzyme genes from *Pseudomonas aeruginosa*

CUI Guoyan<sup>1,2</sup>, LI Zhuang<sup>2</sup>, CUI Jia<sup>1</sup>, LIU Jianling<sup>2</sup> (1. Department of Microbiology of Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi, China; 2. Key Laboratory of Resources Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To clone and express *prpB*, *prpC* and *prpD* genes of key enzymes of propionate metabolism, further analyze and predict PrpB, PrpC and PrpD potential structures and functions and lay the foundation for developing new antimicrobial targets of *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods** The *prpB*, *prpC* and *prpD* of key genes in propionate metabolism from *P. aeruginosa* were cloned into *Escherichia coli* BL21(DE3). The recombinant strains of corresponding genes were constructed and the recombinase were purified with Ni-NTA column affinity chromatography. The molecular weight and purity were determined by SDS-PAGE. Meanwhile, bioinformatics software is employed for detecting the physicochemical properties, hydrophobicity, signal peptide, secondary structure and tertiary structure of PrpB, PrpC and PrpD proteins. **Results** The recombinant bacteria were induced with 0.5 mmol/L at 16 °C overnight. The recombinant proteins PrpB, PrpC and PrpD mainly existed in the form of soluble supernatant. The PrpB, PrpC and PrpD protein, which relative molecular weight was  $32 \times 10^3$ ,  $42 \times 10^3$  and  $55 \times 10^3$  respectively, were purified by Ni-NTA affinity chromatography. PrpB, PrpC and PrpD protein with molecular weights of  $32.14 \times 10^3$ ,  $41.69 \times 10^3$ ,  $54.88 \times 10^3$  were composed of 298, 375 and 494 amino acids respectively, and isoelectric point is 5.33, 6.03 and 6.15; PrpB, PrpC and PrpD protein lacked signal peptide and transmembrane structure is featured by the hydrophilic protein; PrpB, PrpC and PrpD protein localized in the cytoplasm. And  $\alpha$  helix and random coil play the main role in constructing protein elements of the secondary structure of PrpB, PrpC and PrpD protein. **Conclusion** The recombinant protein PrpB, PrpC and PrpD were successfully induced expressed and purified. The results of bioinformatics demonstrated that PrpB, PrpC and PrpD protein are rich in  $\alpha$  helix and irregular curly structures. The study lays a theoretical foundation for revealing the structures of

\* **【基金项目】** 山西省基础研究计划(自由探索类)项目(No. 20210302124230); 山西省高等学校科技创新计划项目(No. 2021L340)

\*\* **【通讯作者】** 刘建玲, E-mail: ljl2003ljl@126.com

**【作者简介】** 崔国艳(1980-), 女, 山西长治人, 博士, 副教授。主要研究方向: 病原微生物功能基因组学。E-mail: cuiguoyan2212@163.com

PrpB, PrpC and PrpD protein and the biological functions of propionate metabolism in *P. aeruginosa*.

【Key words】 *Pseudomonas aeruginosa*; propionate metabolism; protein expression; bioinformatic

丙酸盐是环境中含量丰富的短链脂肪酸之一,是细菌发酵的常见副产物<sup>[1]</sup>。有文献报道肠道细菌在人类消化道中会产生高水平的丙酸,总短链脂肪酸水平可达到 20 到 300 mmol/L,丙酸水平高达 23.1 mmol/kg<sup>[2]</sup>。此外,奇数链脂肪酸经 β 氧化、支链氨基酸降解和胆固醇的分解代谢也会产生丙酰辅酶 A<sup>[3]</sup>。然而丙酸或丙酰辅酶 A 的积累对细胞具有致命毒性。为了应对丙酸和丙酰辅酶 A 的过度积累对细胞造成的危害,细菌进化出了丙酸代谢,可将丙酸或丙酰辅酶 A 转化为琥珀酸和丙酮酸<sup>[4-6]</sup>。丙酸代谢是细菌中广泛分布的一种碳代谢途径,在维持细菌内丙酸和丙酰辅酶 A 分解代谢的有益作用(其骨架是有用的碳源)与其毒性之间的平衡方面发挥重要作用。

丙酸代谢途径中丙酸首先被丙酰辅酶 A 合成酶激活为丙酰辅酶 A,然后有 3 种酶参与丙酸代谢,将丙酸和丙酰辅酶 A 转化为无毒的其他物质,这 3 种酶被认为是丙酸代谢的关键酶,分别为 2-甲基柠檬酸合成酶(2-methylcitrate synthase, MCS)、2-甲基柠檬酸脱水酶(2-methylcitrate dehydratase, MCD)和 2-甲基异柠檬酸裂解酶(2-methylisocitrate lyase, MCL),由相应基因 *prpC*、*prpD* 和 *prpB* 编码<sup>[7]</sup>,而 *prpC*、*prpD* 和 *prpB* 在细菌基因组中往往以操纵子的形式存在,被称为 *prp* 操纵子<sup>[8-9]</sup>。丙酸代谢在丙酸解毒中的重要性已在大肠埃希菌、脑膜炎奈瑟菌、结核分枝杆菌、谷氨酸链球菌及苏云金芽胞杆菌等细菌中得到证实<sup>[4,10-13]</sup>,但是丙酸代谢关键基因 *prpC*、*prpD* 和 *prpB* 在铜绿假单胞菌中的结构和作用尚不清楚。目前生物信息学已广泛应用于生命科学、临床医学及药物筛选与分析等领域<sup>[14]</sup>。本研究通过对丙酸代谢关键酶基因的克隆,构建原核表达载体并表达纯化相应基因表达的 PrpB, PrpC 和 PrpD 蛋白,对 3 种蛋白的结构和功能进行生物信息学预测,为探究丙酸代谢在铜绿假单胞菌中的生物学功能提供理论基础。

## 材料与方法

### 1 材料

**1.1 菌株和质粒** 铜绿假单胞菌株 PAO1, 宿主大肠埃希菌 BL21(DE3) 及质粒 pET-28a(+) 均为本实验室保存。

**1.2 主要试剂和仪器** 苯甲磺酸氟(PMSF)购自上海联迈生物有限公司;异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)和溶菌酶购自北京索莱宝生物公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒和 DNA 纯化回收试剂盒购自北京全式金

生物技术有限公司;质粒小提试剂盒购自日本 Bioflux 公司;金牌 Mix (green) 和 Trans 2K Plus DNA marker 购自北京擎科生物公司;DNA 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自美国 Thermo 公司。

### 2 方法

**2.1 引物设计与基因克隆** 用于扩增丙酸代谢关键酶基因 *prpB*、*prpC* 和 *prpD* 的引物序列见表 1,由上海生物工程有限公司合成。按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明提取铜绿假单胞菌 PAO1 基因组,以其 DNA 为模板 PCR 扩增丙酸代谢关键酶基因 *prpB*、*prpC* 和 *prpD*。50 μL 反应体系:DNA 模板 1 μL,金牌 Mix 45 μL,引物 F 和 R(10 μmol/L)各 2 μL。扩增程序:98 °C 预变性 2 min;98 °C 变性 10 s,56 °C 退火 1 kb/10 s,72 °C 延伸 5 min,共 30 个循环;72 °C 10 min,4 °C 保存。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 产物,用 DNA 纯化试剂盒回收正确的目的片段。

表 1 丙酸代谢关键酶基因 PCR 扩增引物  
Table 1 The primers for PCR amplification of key genes in propionate metabolism

引物名称 Primer name	序列 Sequence
pET- <i>prpB</i> -F	AATGGATCCATGAGCCAGACGTCCTT( <i>Bam</i> HI)
pET- <i>prpB</i> -R	ATT AAGCTTTCAGGCGTTCTTCTTCTGCGC( <i>Hind</i> III)
pET- <i>prpC</i> -F	AATGGATCCATGGCTGAAGCAAAAGTACTGAG( <i>Bam</i> HI)
pET- <i>prpC</i> -R	ATTAAGCTTTCAGCGTTGCTCCAGCGG( <i>Hind</i> III)
pET- <i>prpD</i> -F	AATGGATCCATGAGTGCCAACGTCGATC( <i>Bam</i> HI)
pET- <i>prpD</i> -R	ATTAAGCTTTCAGATCGCCAGGAGTCC( <i>Hind</i> III)

注:下划线碱基为限制性内切酶切位点,斜体为限制性内切酶名称。

Notes: The underlined base indicate the restriction endonuclease binding sites, the restriction endonuclease names are italics.

**2.2 丙酸代谢关键酶基因载体的构建** 将 *prpB*、*prpC*、*prpD* 与 pET28a (+) 质粒用 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切后,用 T4 DNA 连接酶连接,连接产物转化至大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞中,转化菌转接于 SOC 培养基复苏后涂布于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 固体平板,经菌落 PCR 和酶切双验证后委托上海生物工程有限公司测序,将构建正确的重组质粒转化至感受态 *E. coli* BL21。

**2.3 丙酸代谢关键酶的诱导表达** 将构建正确的菌株按 1% 的比例转接至含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养液中,37 °C、220 r/min 培养至 A<sub>600</sub> 值为 0.6~0.8 时加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,同时以未加 IPTG 诱导的作为对照组,16 °C 继续振荡培养 20 h,取 1 mL 诱导后和未诱导的菌液超声破碎,离心,分别收集上清和菌体沉淀,置于 100 °C 金属浴 15 min 变性,采用 12% SDS-PAGE 电泳分析蛋白表达情况。

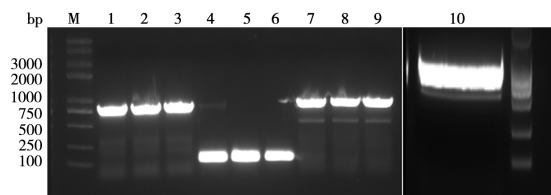
**2.4 丙酸代谢关键酶的分离纯化** 用缓冲液重悬诱导表达的菌体,加入工作浓度为 1 mmol/L 的 PMSF 和 0.5 mg/mL 的溶菌酶,使用低温高压细胞破碎仪破碎细胞,破碎后的菌液于 4 °C、8 000 r/min(离心半径 4.5 cm)离心 40 min,收集上清液,经 0.22 μm 微孔滤器过滤两次上清液后采用镍柱亲和层析纯化重组蛋白,纯化蛋白用超离心管浓缩,采用 NanoDrop 2000 微量分光光度计检测蛋白浓度,-80 °C 保存备用。

**2.5 目的蛋白的生物信息学分析** 利用 ExPasy (https://www.expasy.org) 的 ProtParam 在线软件分析预测目的蛋白的分子质量、等电点、氨基酸组成及不稳定系数等;利用 ProtScale 和 TMHMM Server Version 2.0 在线预测蛋白的疏水性及跨膜结构;利用 SignalP 4.1 Server 软件预测蛋白质信号肽;采用在线网站 http://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\_sopma.pl 预测蛋白的二级结构;利用 SWISS-MODEL(http://swissmodel.expasy.org) 在线预测对目的蛋白进行三维建模;通过在线软件 Hum-mPLo3.0 预测蛋白亚细胞定位 (https://services.healthtech.dtu.dk/cgi-bin/sw\_request)。

## 结 果

### 1 丙酸代谢关键酶基因的克隆与鉴定

PCR 扩增丙酸代谢关键酶基因,扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳分析见图 1A。其中 *prpB* 扩增片段约 900 bp, *prpC* 扩增片段约 1 100 bp, *prpD* 扩增片段约 1 500 bp,均与预期大小一致。*prpB*、*prpC*、*prpD* 扩增片段 Bam HI 和 Hind III 双酶切结果见图 1B,分别得到约 5 400、900、1 100、1 500 bp 的酶切片段。PCR 产物测序后进行比对分析,与 GENE BANK 中的序列一致,载体构建正确。



A 丙酸代谢关键酶基因 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 M DNA 标志物 1~3 *prpB* PCR 产物 4~6 *prpC* PCR 产物 7 *prpD* PCR 产物 B 丙酸代谢关键酶基因 PCR 产物双酶切鉴定 1 *prpB* PCR 产物双酶切 2 *prpC* PCR 产物双酶切 3 *prpD* PCR 产物双酶切

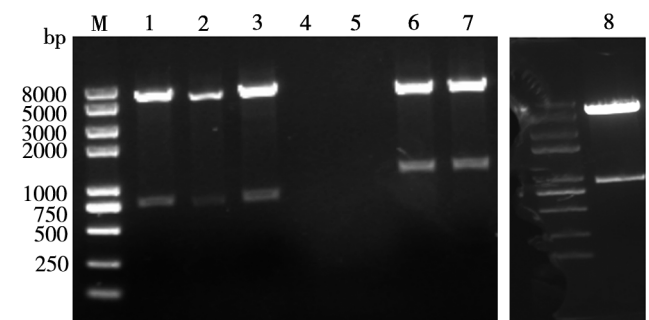
图 1 丙酸代谢关键酶基因 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳分析及双酶切鉴定

M DNA marker 1-3 *prpB* PCR product 4-6 *prpC* PCR product 7 *prpD* PCR product B 1 Doubledigestion of *prpB* PCR product 2 Doubledigestion of *prpC* gene 3 Doubledigestion of *prpD* gene

Fig. 1 PCR products of key genes in propionate metabolism were analyzed by 1% agarose gelelectrophoresis and double restriction enzyme digestion identification

### 2 丙酸代谢关键酶的诱导表达

将构建正确的重组质粒 pET28a-*prpB*、pET28a-*prpC*、pET28a-*prpD* 化转至 *E. coli* BL21(DE3) 中异源表达,通过 SDS-PAGE 分析目标蛋白表达情况,结果见图 2。*prpB* 重组菌经 IPTG 诱导后的菌液和上清液中检测到约  $35 \times 10^3$  蛋白,与 PrpB 理论相对分子质量 ( $35.1 \times 10^3$ ) 一致;*prpC* 重组菌经 IPTG 诱导后的菌液和上清液中均检测到约  $42 \times 10^3$  蛋白,与 PrpC 理论分子质量 ( $41.7 \times 10^3$ ) 一致;*prpD* 重组经 IPTG 诱导后的菌液和上清液中均检测到约  $54 \times 10^3$  蛋白,与 PrpD 理论分子质量 ( $54.8 \times 10^3$ ) 一致。表明 IPTG 成功诱导表达出目的蛋白,且主要以可溶性形式存在于上清液中。



M 蛋白标志物 1,5,9 未经 IPTG 诱导的发酵上清液 2,6,10 经 IPTG 诱导的发酵上清液 3,4,7,8,11,12 纯化后的重组蛋白

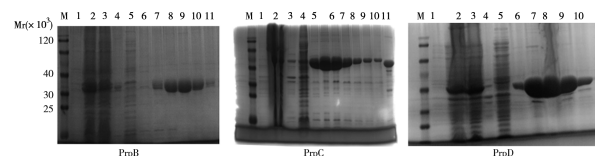
图 2 SDS-PAGE 分析 PrpB、PrpC 和 PrpD 蛋白的表达

M Protein marker 1,5,9 Fermentation without IPTG 2,6,10 Fermentation with IPTG 3,4,7,8,11,12 The purified recombinant proteins

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of PrpB, PrpC and PrpD protein expression

### 3 丙酸代谢关键酶的纯化

用 300 mmol/L 咪唑缓冲液梯度洗脱,采用镍柱亲和层析法对重组蛋白 PrpB、PrpC、PrpD 进行纯化,得到的目的蛋白纯度较高(图 3)。



M 蛋白标志物 1,6,12 未经 IPTG 诱导的发酵上清液 2,7,13 经 IPTG 诱导的发酵上清液 3,8,14 细胞裂解物上清液 4,5,9-11,15-17 纯化后的重组蛋白

图 3 镍柱亲和层析纯化 PrpB、PrpC、PrpD 蛋白的 SDS-PAGE 分析

M Protein marker 1,6,12 Fermentation without IPTG 2,7,13 Fermentation with IPTG 3,8,14 Supernatant of cell lysate 4,5,9-11,15-17 The purified recombinant proteins

Fig. 3 The separation and purification of PrpB, PrpC and PrpD protein

### 4 丙酸代谢关键酶蛋白的生物信息学分析

**4.1 理化性质** *prpB*、*prpC*、*prpD* 全长分别为 894、1 125、1 482 bp,编码的 PrpB、PrpC、PrpD 蛋白氨



氨基酸个数分别为 298、375、494。预测 PrpB、PrpC、PrpD 蛋白的理论分子量分别为  $32.14 \times 10^3$ 、 $41.69 \times 10^3$ 、 $54.88 \times 10^3$ ，理论等电点 (PI) 分别为 5.33、6.03、6.15，带负电的 (Asp+Glu) 氨基酸残基数分别为 38、47、62 个，带正电的 (Arg+Lys) 氨基酸残基数分别为 31、41、54 个，不稳定系数分别为 36.71、24.33、35.55，脂肪指数分别为 91.44、85.15、93.48。在大肠埃希菌中的半衰期均  $>10$  h，在酵母细胞中的半衰期均  $>20$  h。PrpB、PrpC、PrpD 蛋白的氨基酸组成见表 2。

表 2 PrpB、PrpC、PrpD 蛋白的氨基酸组成  
Table 2 Amino acid composition of PrpB, PrpC, PrpD protein

氨基酸 Aminoacid	数量(个) Quantity(Piece)			占比(%) Proportion		
	PrpB	PrpC	PrpD	PrpB	PrpC	PrpD
Ala (A)	44	41	59	14.8	10.9	11.9
Arg (R)	17	21	38	5.7	5.6	7.7
Asn (N)	9	9	14	3.0	2.4	2.8
Asp (D)	23	19	34	7.7	5.1	6.9
Cys (C)	4	4	8	1.3	1.1	1.6
Gln (Q)	11	17	17	3.7	4.5	3.4
Glu (E)	15	28	28	5.0	7.5	5.7
Gly (G)	19	28	30	6.4	7.5	6.1
His (H)	5	11	18	1.7	2.9	3.6
Ile (I)	15	16	24	5.0	4.3	4.9
Leu (L)	25	39	54	8.4	10.4	10.9
Lys (K)	14	20	16	4.7	5.3	3.2
Met (M)	11	10	11	3.7	2.7	2.2
Phe (F)	13	17	19	4.4	4.5	3.8
Pro (P)	9	16	25	3.0	4.3	5.1
Ser (S)	15	21	27	5.0	5.6	5.5
Thr (T)	18	19	19	6.0	5.1	3.8
Trp (W)	0	4	6	0.0	1.1	1.2
Tyr (Y)	6	13	13	2.0	3.5	2.6
Val (V)	25	22	34	8.4	5.9	6.9

4.2 蛋白的疏水性、信号肽及跨膜结构预测 预测 PrpB、PrpC、PrpD 蛋白的总平均亲水性分别为 0.032、-0.234、-0.140。疏水性分析结果见图 4。PrpB、PrpC、PrpD 蛋白具有较好的亲水性，无明显疏水性结构。Signal IP 4.1Server 在线预测 PrpB、PrpC、PrpD 蛋白不含信号肽 (图 5)；TMHMM Serverv. 2.0 在线预测 PrpB、PrpC、PrpD 蛋白跨膜螺旋数为 0，表明 3 种蛋白均属非跨膜蛋白 (图 6)。

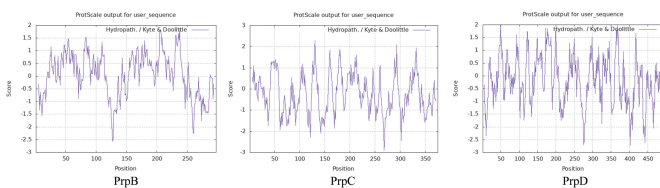


图 4 PrpB、PrpC、PrpD 蛋白的疏水性分析  
Fig. 4 Hydrophobicity analysis of PrpB, PrpC, PrpD protein

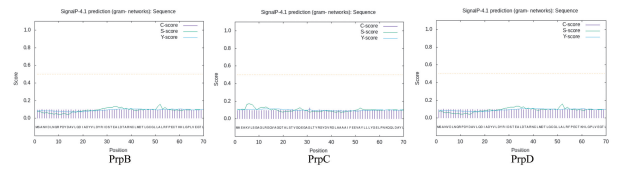


图 5 PrpB、PrpC、PrpD 蛋白的信号肽预测  
Fig. 5 Signal peptide prediction of PrpB, PrpC, PrpD protein

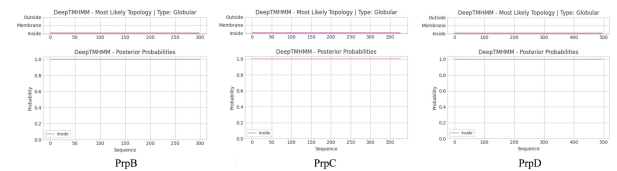


图 6 PrpB、PrpC、PrpD 蛋白的跨膜区预测  
Fig. 6 Transmembrane region prediction of PrpB, PrpC, PrpD protein

4.3 蛋白的二级结构 利用在线软件 SOPMA 预测 PrpB、PrpC、PrpD 蛋白的二级结构，结果见表 3 和图 7。 $\alpha$  螺旋、延伸链、 $\beta$  转角和无规则卷曲参与 PrpB、PrpC、PrpD 蛋白二级结构的形成，其中  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲是主要的蛋白质元件。

表 3 PrpB、PrpC、PrpD 蛋白二级结构组成  
Table 3 composition of PrpB, PrpC, PrpD protein

蛋白 Protein	$\alpha$ 螺旋 $\alpha$ helix		延伸链 Extended strand		$\beta$ 转角 $\beta$ turn		无规则卷曲 Random coil	
	个 Piece	占比(%) Proportion	个 Piece	占比(%) Proportion	个 Piece	占比(%) Proportion	个 Piece	占比(%) Proportion
PrpB	162	54.36	35	11.74	22	7.38	79	26.51
PrpC	203	54.13	34	9.07	26	6.93	112	29.87
PrpD	245	49.60	48	9.72	22	4.45	179	36.23

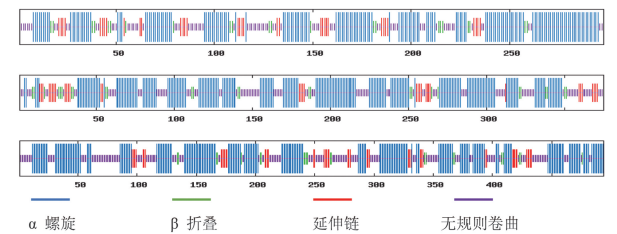


图 7 PrpB、PrpC、PrpD 蛋白二级结构预测  
Fig. 7 Secondary structure prediction of PrpB, PrpC, PrpD protein

4.4 蛋白的三级结构 利用 SWISS-MODEL 对 PrpB、PrpC、PrpD 蛋白进行同源建模 (图 8)。PrpB 以 1xg3.1.A (*Escherichia coli*) 为模板，GMQE 值为 0.91，QMEAN 值为  $0.87 \pm 0.05$  (分数范围为 0-1，分数越大模型质量越高)，其与 PrpB 一致性为 76.71%，达到同源建模要求。 $\alpha$  螺旋占 49.60%，无规则卷曲占 36.23%， $\beta$  转角占 4.45%。PrpC 以 6s87.2.A (*Pseudomonas aeruginosa*) 为模板，GMQE 值为 0.96，QMEAN 值为  $0.89 \pm 0.05$ ，其与 PrpC 一致性为 100%，建模质量好，匹配度高，达到同源建模要求。 $\alpha$

螺旋占 54.13%，无规则卷曲占 29.87%， $\beta$ 转角占 6.93%。PrpD 以 6s62.1.A (*Pseudomonas aeruginosa*) 为模板，GMQE 值为 0.95，QMEAN 值为  $0.89 \pm 0.05$ ，其与 PrpD 一致性为 99.80%，达到同源建模要求。 $\alpha$ 螺旋占 49.60%；无规则卷曲占 36.23%； $\beta$ 转角占 4.45%。

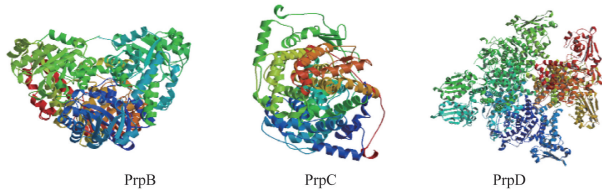


图 8 PrpB、PrpC、PrpD 的三级结构预测  
Fig. 8 Tertiary structure prediction of PrpB, PrpC, PrpD

**4.5 蛋白的亚细胞定位** 经 TargetP-2.0 分析，PrpB、PrpC、PrpD 蛋白定位于细胞质中，得分分别为 1.748416、0.350613、0.759303，符合 2-甲基柠檬酸裂解酶、2-甲基柠檬酸合成酶和 2-甲基柠檬酸脱水酶的功能特征，与在其他细菌中的功能一致。

## 讨 论

铜绿假单胞菌是一种常见革兰阴性环境微生物，极易在囊性纤维化患者、烧伤患者和免疫缺陷的个体中引起严重的急性和慢性感染，已被世界卫生组织指定为引起医疗感染的巨大威胁<sup>[15]</sup>。铜绿假单胞菌也是医疗器械(如导管、雾化器、加湿器)常见定植菌，可引起呼吸机相关肺炎、脑膜脑炎和败血症等<sup>[16]</sup>，是导致医院感染的病原体之一。铜绿假单胞菌基因组大小为 6.3 Mbp，其遗传复杂性接近于简单的真核生物酿酒酵母，含有大量参与代谢的基因，而参与代谢的一些酶在细菌中高度保守<sup>[17-18]</sup>，是了解该病原体的病理适应性的关键，鉴于丙酸代谢广泛存在于多种感染中，丙酸代谢途径关键基因已被确定为开发新型抗菌剂的一个强有力靶点<sup>[3]</sup>，因此掌握相关蛋白在铜绿假单胞菌中的表达、功能及定位至关重要。

丙酸代谢最初被认为只存在于真菌中，如溶脂假丝酵母和巢曲霉菌<sup>[19]</sup>。20 世纪 90 年代末，相关研究报告肠炎沙门菌和大肠埃希菌中也存在丙酸代谢<sup>[20-21]</sup>，而且丙酸代谢主要由 3 种核心酶催化：即 PrpC、PrpD 和 PrpB<sup>[7]</sup>。结核分枝杆菌中也存在丙酸代谢，但其染色体不编码 PrpB 蛋白，其功能在生理条件下由乙醛酸循环关键酶-异柠檬酸裂解酶取代完成<sup>[22]</sup>。但是 PrpB、PrpC、PrpD 蛋白酶在铜绿假单胞菌中的结构和作用目前仍不清楚。本实验选择 PrpB、PrpC、PrpD 蛋白为研究对象，利用原核表达技术快速高效地分离纯化出目的蛋白，为进一步研究 PrpB、

PrpC、PrpD 蛋白在丙酸代谢中的功能奠定了基础。

在过去的十年里，“组学”时代信息和技术快速增长，传统的基因-基因的研究方法不足以满足生物学研究的增长和需求<sup>[23]</sup>。生物信息学通过以计算机为工具对大量的生物信息数据进行存储、检索及分析解释，成为基因组研究的有力工具。本研究利用生物信息学方法预测 PrpB、PrpC 和 PrpD 蛋白氨基酸组成分别为 298、375、494 个，分子质量分别为  $32.14 \times 10^3$ 、 $41.69 \times 10^3$ 、 $54.88 \times 10^3$ ，等电点分别为 5.33、6.03、6.15。3 种蛋白均为亲水性蛋白，无信号肽及跨膜结构。 $\alpha$ 螺旋和无规则卷曲是 PrpB、PrpC 和 PrpD 蛋白二级结构的主要蛋白质元件。重组 PrpB、PrpC 和 PrpD 蛋白的表达和纯化及其生物信息学分析对理解 3 种蛋白结构和功能的关系具有重要意义，同时为铜绿假单胞菌疾病的防治及其耐药性的应对方案提供了更多的研究思路和理论依据。

## 【参考文献】

- [1] Horswill AR, Dudding AR, Escalante-Semerena JC. Studies of propionate toxicity in *Salmonella enterica* identify 2-methylcitrate as a potent inhibitor of cell growth [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(22):19094-19101.
- [2] Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, et al. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood [J]. *Gut*, 1987, 28(10):1221-1227.
- [3] Dolan SK, Wijaya A, Geddis SM, et al. Loving the poison: the methylcitrate cycle and bacterial pathogenesis [J]. *Microbiology (Reading)*, 2018, 164(3):251-259.
- [4] Zheng C, Yu Z, Du C, et al. 2-Methylcitrate cycle: a well-regulated controller of *Bacillus sporulation* [J]. *Environ Microbiol*, 2020, 22(3):1125-1140.
- [5] Feng J, He L, Xiao X, et al. Methylcitrate cycle gene MCD is essential for the virulence of *Talaromyces marneffeii* [J]. *Med Mycol*, 2020, 58(3):351-361.
- [6] Masiewicz P, Wolanski M, Brzostek A, et al. Propionate represses the dnaA gene via the methylcitrate pathway-regulating transcription factor, PrpR, in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2014, 105(5):951-959.
- [7] Rocco CJ, Escalante-Semerena JC. In *Salmonella enterica*, 2-methylcitrate blocks gluconeogenesis [J]. *J Bacteriol*, 2010, 192(3):771-778.
- [8] Reddick JJ, Sirkisoon S, Dahal RA, et al. First biochemical characterization of a methylcitric acid cycle from *Bacillus subtilis* Strain 168 [J]. *Biochemistry*, 2017, 56(42):5698-5711.
- [9] 都萃颖, 王菲, 严婉芊, 等. 细菌中 2-甲基柠檬酸循环研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2020, 47(5):1582-1588.
- [10] Catenazzi MC, Jones H, Wallace I, et al. A large genomic island allows *Neisseria meningitidis* to utilize propionic acid, with implications for colonization of the human nasopharynx [J]. *Mol Microbiol* 2014, 93(2):346-355.

(下转 556 页)

- inflammasome[J]. *Molecules*, 2020, 25(23):5533.
- [5] Huang Y, Xu W, Zhou R. NLRP3 inflammasome activation and cell death[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9):2114-2127.
- [6] Hooftman A, Angiari S, Hester S, et al. The immunomodulatory metabolite itaconate modifies NLRP3 and inhibits inflammasome activation[J]. *Cell Metab*, 2020, 32(3):468-478.
- [7] Di Martile M, Gabellini C, Desideri M, et al. Inhibition of lysine acetyltransferases impairs tumor angiogenesis acting on both endothelial and tumor cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1):103.
- [8] Zhang X, Li C, Chen D, et al. *Helicobacter pylori* CagA activates the NLRP3 inflammasome to promote gastric cancer cell migration and invasion[J]. *Inflamm Res*, 2022, 71(1):141-155.
- [9] 蒋建焯, 刘胜, 罗晶晶, 等. NLRP3 炎症小体及其下游分子在幽门螺杆菌感染小鼠的表达[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29(08):785-788+793.
- [10] Amalia R, Panenggak NSR, Doohan D, et al. A comprehensive evaluation of an animal model for *Helicobacter pylori*-associated stomach cancer: Fact and controversy[J]. *Helicobacter*, 2023, 28(1):e12943.
- [11] Onorati AV, Dyczynski M, Ojha R, et al. Targeting autophagy in cancer[J]. *Cancer*, 2018, 124(16):3307-3318.
- [12] Atkinson JM, Ye Y, Gebru MT, et al. Time-resolved FRET and NMR analyses reveal selective binding of peptides containing the LC3-interacting region to ATG8 family proteins[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(38):14033-14042.
- [13] Popelka H, Klionsky DJ. Structural basis for extremely strong binding affinity of giant ankyrins to LC3/GABARAP and its application in the inhibition of autophagy[J]. *Autophagy*, 2018, 14(11):1847-1849.
- [14] Wong MM, Chan HY, Aziz NA, et al. Interplay of autophagy and cancer stem cells in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(4):3695-3717.
- [15] 张家祥, 王文霸, 闫曙光, 等. CagA 和 VacA 抑制胃黏膜上皮细胞的自噬并促进胃癌前病变的恶化[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2022, 47(7):942-951.
- [16] 曹真睿, 贺桂琼, 龙志敏. 自噬与 NLRP3 炎症小体激活间的相互作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2019, 35(6):599-605.
- [17] Wu L, Jiang F, Shen X. *Helicobacter pylori* CagA protein regulating the biological characteristics of gastric cancer through the miR-155-5p/SMAD2/SP1 axis[J]. *Pathogens*, 2022, 11(8):846.
- [18] Sterbenc A, Jarc E, Poljak M, et al. *Helicobacter pylori* virulence genes[J]. *World J Gastroenterol*. 2019, 25(33):4870-4884.
- [19] Hwang YJ, Kim N, Lee HS, et al. Reversibility of atrophic gastritis and intestinal metaplasia after *Helicobacter pylori* eradication—a prospective study for up to 10 years[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 47(3):380-390.
- [20] Beckett AC, Loh JT, Chopra A, et al. *Helicobacter pylori* genetic diversification in the Mongolian gerbil model[J]. *PeerJ*, 2018(6):e4803.
- [21] Ansari S, Yamaoka Y. Animal models and *Helicobacter pylori* infection[J]. *J Clin Med*, 2022, 11(11):3141.
- [22] Mahant S, Mehra S, Chhawchharia A, et al. Prevalence of tumor necrosis factor alpha inducing protein (tipα) gene of *Helicobacter pylori* and its association with upper gastrointestinal diseases in India[J]. *Biotech*, 2021, 11(5):246.
- [23] Song N, Liu ZS, Xue W, et al. NLRP3 phosphorylation is an essential priming event for inflammasome activation[J]. *Mol Cell*, 2017, 68(1):185-197.
- [24] Yang L, Li C, Jia Y. MicroRNA-99b promotes *Helicobacter pylori*-induced autophagy and suppresses carcinogenesis by targeting mTOR[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(4):5355-5360.
- [25] He Y, Wang C, Zhang X, et al. Sustained exposure to *Helicobacter pylori* lysate inhibits apoptosis and autophagy of gastric epithelial cells[J]. *Front Oncol*, 2020(10):581364.
- [26] 袁玲, 马颖才, 荣光宏, 等. 胃癌与自噬的研究进展[J]. *癌症进展*, 2022, 20(11):1092-1095.

【收稿日期】 2022-12-21 【修回日期】 2023-03-06

(上接 551 页)

- [11] Plassmeier J, Persicke M, Puhler A, et al. Molecular characterization of PrpR, the transcriptional activator of propionate catabolism in *Corynebacterium glutamicum* [J]. *J Biotechnol*, 2012, 159(1):1-11.
- [12] Singhal A, Arora G, Virmani R, et al. Systematic analysis of mycobacterial acylation reveals first example of acylation-mediated regulation of enzyme activity of a bacterial phosphatase [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(43):26218-26234.
- [13] Simonte FM, Dotsch A, Galego L, et al. Investigation on the anaerobic propionate degradation by *Escherichia coli* K12 [J]. *Mol Microbiol*, 2017, 103(1):55-66.
- [14] 于子萍, 兰添, 陈伟月, 等. 猪急性腹泻综合征冠状病毒膜蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(8):873-879.
- [15] Jurado-Martin I, Sainz-Mejias M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6):3128.
- [16] Daddaoua A, Molina-Santiago C, de la Torre J, et al. GtrS and GtrR form a two-component system: the central role of 2-ketogluconate in the expression of exotoxin A and glucose catabolic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(12):7654-7663.
- [17] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen [J]. *Nature*, 2000, 406(6799):959-964.
- [18] Crousilles A, Maunders E, Bartlett S, et al. Which microbial factors really are important in *Pseudomonas aeruginosa* infections? [J]. *Future Microbiol*, 2015, 10(11):1825-1836.
- [19] Tabuchi T, Serizawa N, Uchiyama H J A, et al. A novel pathway for the partial oxidation of propionyl-CoA to pyruvate via seven-carbon tricarboxylic acids in yeasts [J]. *Agricul Biol Chem*, 1974, 38(12):2571-2572.
- [20] Horswill AR. *Salmonella typhimurium* LT2 catabolizes propionate via 2MC [J]. *J Bacteriol*, 1999, 181(18):5615-5623.
- [21] London RE, Allen DL, Gabel SA, et al. Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of metabolism of propionate by *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 1999, 181(11):3562-3570.
- [22] Eoh H, Rhee KY. Methylcitrate cycle defines the bactericidal essentiality of isocitrate lyase for survival of *Mycobacterium tuberculosis* on fatty acids [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(13):4976-4981.
- [23] Tao Ziqi, Aimin S, Li Rui, et al. Microarray bioinformatics in cancer—a review [J]. *JBUON*, 2017, 22(4):838-843.

【收稿日期】 2022-12-27 【修回日期】 2023-03-05