

DOI:10.13350/j.cjpb.230606

• 论著 •

# 鼠伤寒沙门菌效应蛋白 SteC 核心结构域及其激酶活性研究

张敏,戴元吉,谢荣现,王书涵,王玮玮,贾海红,李翠玲,宋楠楠,李冰清<sup>\*\*</sup>,岳盈盈<sup>\*\*</sup>

(山东第一医科大学(山东省医学科学院)临床与基础医学院(基础医学研究所)病原生物学系,山东济南 250000)

**【摘要】** 目的 鼠伤寒沙门菌效应蛋白 SteC 是沙门菌Ⅲ型分泌系统分泌的具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的蛋白,在蛋白磷酸化修饰中发挥重要作用。然而关于 SteC 催化磷酸化的机制尚不清楚。本研究通过分析 SteC 核心结构域的组成并构建原核表达体系,了解表达蛋白的性状并进行酶活性测定,为揭示 SteC 作为沙门菌激酶催化磷酸化的机制奠定基础。方法 以生物信息学分析和液相色谱-质谱(LC-MS)联用分析技术为基础,通过基因克隆技术构建 SteC 蛋白原核表达体系,表达目的蛋白,使用 Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱纯化 SteC 全长蛋白 SteC-fl 及 C 端蛋白 SteC-C。采用蛋白酶裂解法,用不同浓度的胰蛋白酶对纯化的 SteC-C 蛋白进行酶切,选择稳定表达的区域进行 LC-MS 及 DNASTAR 软件肽段序列鉴定及比对,确定 SteC 蛋白的核心结构域,进而构建核心结构域原核表达体系,探究蛋白的性状。使用 Phos-tag SDS-PAGE 胶对 SteC 核心结构域蛋白进行酶活性验证,以确定 SteC 的核心区域是否具有活性。结果 成功构建 SteC-fl、SteC-C 原核表达体系并获得目的蛋白,但 SteC-fl 蛋白得率低,因而选择 SteC-C 利用蛋白酶裂解法确定 SteC 稳定表达的区域。利用 LM-MS 方法及 DNASTAR 软件分析 SteC 核心结构域(即 227aa-305aa)并成功构建 SteC<sub>227-305</sub> 原核表达体系。表达的 SteC<sub>227-305</sub> 蛋白经 Ni<sup>2+</sup>亲和层析纯化后进行分析,其稳定性高于 SteC-fl、SteC-C 端,但可溶性差;使用 Phos-tag 复合胶对 SteC<sub>227-305</sub> 蛋白进行酶活性验证,显示此结构域具有较弱的自磷酸化功能。结论 成功构建鼠伤寒沙门菌效应蛋白 SteC 不同区域的原核表达体系(SteC-fl、SteC-C、SteC<sub>227-305</sub>)。利用 LM-MS 确定 SteC 核心结构域为 227aa-305aa,生物信息学分析显示 SteC<sub>227-305</sub> 含有 PKc\_like 保守结构域,稳定系数为 29.23,即为稳定蛋白。SteC<sub>227-305</sub> 经 Ni<sup>2+</sup>亲和层析纯后其可溶性差而稳定性符合预期;Phos-tag 复合胶验证其具有较弱的自磷酸化功能,为研究 SteC 蛋白催化磷酸盐转移的机制奠定了基础。

**【关键词】** SteC;蛋白磷酸化;蛋白激酶;核心结构域;鼠伤寒沙门菌

**【中图分类号】** R378.23

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)06-0650-07

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Jun;18(6):650-656,661.]

## Probing the core domain and kinase activity of Salmonella effector protein SteC

ZHANG Min, DAI Yuanji, XIE Rongxian, WANG Shuhan, WANG Weiwei, JIA Haihong, LI Cuiling, SONG Nannan, LI Bingqing, YUE Yingying (Department of Pathogen Biology, School of Clinical and Basic Medicine, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250000, China) <sup>\*\*</sup>

**【Abstract】** **Objective** The *Salmonella typhimurium* effector protein SteC is a protein secreted by the *Salmonella* Type III secretion system with serine/threonine kinase activity, playing an important role in protein phosphorylation modification. However, the mechanism of SteC catalyzed phosphorylation is still unclear. This study analyzed the composition of the core structural domain of SteC and constructed a prokaryotic expression system to understand the characteristics of the expressed protein and determine its enzyme activity, laying the foundation for revealing the mechanism of SteC as a *Salmonella* kinase catalyzing phosphorylation. **Methods** Based on bioinformatics analysis and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis techniques, a prokaryotic expression system for SteC protein was constructed using gene cloning technology to express the target protein. The full-length protein SteC-fl and C-terminal protein SteC-C were purified using Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography column. Using protease lysis method, purified SteC-C protein was digested with different concentrations of trypsin, and stable expression regions were selected for LC-MS and DNASTAR software peptide sequence identification and comparison to determine the core domain of SteC protein. Subsequently, a prokaryotic expression system for the core domain was constructed to explore the protein's characteristics. Use Phos-tag gel to validate the enzyme activity of the SteC core domain protein to determine whether the

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 31800054;32170034;81902038)。

\*\* **【通讯作者】** 李冰清, E-mail: bingqingsdu@163.com; 岳盈盈, E-mail: yyy0513@163.com

**【作者简介】** 张敏(1997-),女,山东人,硕士在读。主要研究方向:病原微生物致病机制。E-mail:15662004814@163.com

core region of SteC is active. **Results** Successfully constructed the SteC-fl and SteC-C prokaryotic expression systems and obtained the target protein, but the yield of SteC-fl protein was low. Therefore, SteC-C was chosen to use protease lysis to determine the stable expression region of SteC. Using LM-MS method and DNASTAR software to analyze the core structural domain of SteC (227aa-305aa) and successfully construct the prokaryotic expression system of SteC<sub>227-305</sub>. The expressed SteC<sub>227-305</sub> protein was purified by Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography and analyzed. Its stability was higher than that of SteC-fl and Ste C-C terminus, but its solubility was poor; Enzymatic activity validation of SteC<sub>227-305</sub> protein using Phos-tag composite gel showed that this domain has weak self-phosphorylation function. **Conclusion** Successfully constructed prokaryotic expression systems for different regions of *Salmonella typhimurium* effector protein SteC (SteC-fl, SteC-C, SteC<sub>227-305</sub>). Using LM-MS to determine the core structural domain of SteC as 227aa-305aa, bioinformatics analysis shows that SteC<sub>227-305</sub> contains PKC\_ Like conserved domain, with a stability coefficient of 29.23, is a stable protein. After purification by Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography, SteC<sub>227-305</sub> has poor solubility and meets the expected stability; Phos tag gel has been verified to have weak self-phosphorylation function, laying a foundation for studying the mechanism of phosphate transfer catalyzed by SteC protein.

**【Key words】** SteC; Protein phosphorylation; Protein kinase; Core structure domain; *Salmonella typhimurium*

鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*) 是常见的革兰阴性细菌病原体,也是导致人类胃肠炎的原因之一<sup>[1]</sup>, III型分泌系统(T3SS)是其关键的毒力机制。鼠伤寒沙门菌通过 T3SS 将毒力蛋白从细菌细胞质运输到宿主细胞胞浆中以促进细菌的生存,从而刺激或干扰宿主细胞正常的生理功能,导致疾病的发生<sup>[2]</sup>。毒力蛋白也被称为效应蛋白(effector),具有独特的生化活性并在蛋白翻译后修饰中发挥作用<sup>[3]</sup>。

SteC 是鼠伤寒沙门菌 T3SS 分泌的一种具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性的效应蛋白<sup>[4]</sup>,是最大和最多样化的蛋白激酶超家族的一员。蛋白激酶作为真核细胞功能的关键调控因子通过对目标蛋白的丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸残基的磷酸化调节细胞的增殖、运动、信号传导及磷酸化各种底物<sup>[5]</sup>。而蛋白激酶的活性与酶的磷酸化状态密切相关,如上游激酶的磷酸化、蛋白激酶环中关键氨基酸残基的调节及自磷酸化调节<sup>[6]</sup>。具有激酶活性的蛋白质均可使用三磷酸腺苷(ATP)作为腺苷供体而发挥磷酸化功能<sup>[7]</sup>,而酪氨酸残基上的磷酸化则是由 ATP 依赖性蛋白酪氨酸激酶的自磷酸化催化产生且在细菌致病性中发挥作用<sup>[8]</sup>。Phon 等<sup>[9]</sup>报道沙门菌致病岛 2(SPI-2)分泌的 SteC 是一种激酶,并通过体外生化实验证实 SteC 具有激酶活性,且该活性受到自身磷酸化的调节,而第 256 位的赖氨酸是其酶活中心。Heggie 等<sup>[10]</sup>将 SteC 的氨基酸序列与细菌激酶序列进行比对,发现 SteC-C 端具有高度保守的激酶亚结构域,而其 N 端则为结合结构域。Odendall 等<sup>[11]</sup>报道 SteC 在 MEK、ERK、MLCK 及肌球蛋白 IIB 通路中发挥磷酸化功能。Walch 等<sup>[12]</sup>通过免疫共沉淀实验发现 SteC 可直接磷酸化 FMNL1 蛋白从而促进肌动蛋白捆绑,并且利用尺寸排阻色谱实验验证 SteC 与 FMNL1 具有相互作用。而 Correia 等<sup>[13]</sup>的研究发现 PinT 作为沙门菌毒力中的核心转录

后调节因子,对蛋白激酶 SteC 的翻译后修饰具有抑制作用。尽管 SteC 作为沙门菌目前已知的唯一一种激酶在翻译后修饰中发挥重要作用,但其催化磷酸化机制尚未阐明。为了深入了解 SteC 催化的磷酸化机制,本研究拟构建 SteC-fl 及 SteC-C 的原核表达体系,并采用蛋白酶裂解法获得 SteC 相对稳定的区域后通过 LS-MS 探究其核心结构域所包含的氨基酸肽段,从而构建原核表达体系获得目的蛋白,用于分析蛋白性状。使用 Phos-tag 复合胶对 SteC 进行酶活验证,明确核心结构域是否具有激酶活性,为 SteC 的功能研究提供依据。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

**1.1 载体及菌株** pGI01 载体由 pET15b 载体改造;菌株 STM14028S 购自美国 ATCC 菌种库。

**1.2 主要试剂和仪器** 胰蛋白酶,十二烷基硫酸钠(SDS),溴酚蓝(BPB)和二硫苏糖醇(DTT)购自北京索莱宝科技有限公司;镍离子亲和层析柱购自美国 Cytiva 公司;DNA 聚合酶,限制性核酸内切酶 BamH\_I、Xho\_I, T4 DNA 连接及高速低温离心机酶购自美国 Thermo 公司;Phos-tag Acrylamide 购自上海金畔生物科技有限公司。

### 2 方法

**2.1 SteC 蛋白的生物信息学分析** Uniprot 数据库查询 SteC 蛋白氨基酸序列,使用多种生物信息学在线软件(表 1)对 SteC 蛋白的基本理化性质、结构、磷酸化位点及功能进行预测分析。

**2.2 SteC His 标签融合蛋白重组菌株的构建及鉴定** 利用 DNASTAR 软件设计两对引物(表 2),由济南博尚公司合成。以 ATCC 14028s 菌株 DNA 为模板,使用表 2 中的引物 PCR 扩增目的基因,其产物使用 DNA

胶回收试剂盒纯化后与 pG101 载体分别用 BamH<sub>I</sub> 和 Xho<sub>I</sub> 内切酶在 37 °C 双酶切 3 h。回收酶切载体与目的片段,经 T4 连接酶在 22 °C 连接 3 h 后转入大肠埃希菌 BL21 感受态细胞,复苏 2.5 h 后涂于 Amp<sup>+</sup> 抗性固体 LB 平板,37 °C 恒温培养箱过夜。选择固体平板上的单克隆菌落转种于 1.5 mL Ep 管内(含 1 mL Amp<sup>+</sup> 抗性的液体 LB 培养基)进行培养,待 A<sub>600</sub> 值为 0.4 时加入终浓度为 0.6 mmol/L 的诱导剂 IPTG 过夜,诱导蛋白的表达。取菌液 10 000 r/min (离心半径 7 cm) 离心 2 min,收集菌体,加入 2× loading buffer 混匀,煮沸处理后上样进行 SDS-PAGE 电泳,分析目的蛋白表达情况,阳性菌株送济南博尚公司鉴定,鉴定正确的菌株命名分别为 SteC-fl,SteC-C。

表 1 SteC 蛋白生物信息学分析在线网址及功能  
Table 1 The online websites of Bioinformatics analysis

网址 Website	功能 Function
https://www.uniprot.org/	氨基酸序列
http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam	基本理化性质分析
http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/	蛋白质磷酸化位点
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd	蛋白质保守结构预测
https://drug.ai.tencent.com/cn	三级结构预测

表 2 PCR 扩增引物  
Table 2 Primers used in PCR amplification

引物名称 Segment	引物序列(5'-3') Sequences of primer	用途 Application
SteC 1-F	ATAGGATCCATGCCGTTTAC ATTTCAGATCG	扩增 SteC 基因全长
SteC 1-R	ATACTCGAGTTATTTTTTTT AATTCATCCTTTAATACC	
SteC 2-F	ATAGGATCCGCCACGGCGT CTGGTTATG	扩增 SteC 基因 C 端
SteC 2-R	ATACTCGAGTTATTTTTTTT AATTCATCCTTTAATACC	

**2.3 SteC His 标签融合蛋白的纯化** 参考杨银龙等<sup>[14]</sup>的蛋白提取方法,低温诱导目的蛋白表达,并使用镍离子柱进行初步纯化。随后使用凝胶层析柱进一步纯化蛋白,根据分子筛图谱中的出峰位置收集对应管内的蛋白并取样进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。根据电泳结果将纯度高的蛋白分装于 1.5 mL EP 管内,液氮速冻后存于 -80 °C 冰箱。

**2.4 胰蛋白酶切试验** 用不同浓度的胰蛋白酶进行酶切试验,将蛋白质上阻碍晶体生长的柔软的不规则的部位切掉,从而获取相对结实的结构域。配制不同浓度的胰蛋白酶溶液(2、1、1/3、1/9、1/27、1/81、1/243、1/729 mg/mL 和 0 mg/mL),每个浓度的胰蛋白酶溶液中各加入 20 μL 纯化的融合蛋白(含终浓度为 3 mmol/L DTT),混匀后于 4 °C 反应 30 min,加入同等体积的 2× loading buffer 终止反应。

**2.5 SteC 蛋白的质谱分析** SteC 蛋白酶切产物经 SDS-PAGE 电泳后使用考马斯亮蓝染色,切割相应位置的蛋白胶条带委托上海中科新生命生物科技有限公司进行质谱分析。

**2.6 SteC 蛋白核心结构域表达菌株的构建及目的蛋白的表达、鉴定与纯化** 分析质谱结果并进行氨基酸肽段比对,根据匹配到肽段的质谱总数及预测的 SteC-C 三级结构分析选取氨基酸区域进行基因克隆,构建 His 标签融合蛋白表达菌株并将阳性表达菌株进行鉴定,鉴定正确的菌株命名为 SteC<sub>227-305</sub> 用于蛋白的表达、纯化及自磷酸化功能验证,方法同 2.2 和 2.3。引物信息:SteC 227-F:5'-ATAGGATCCATGAATA TTCGCATGCGTGAT-3';SteC 305-R:5'-ATACTC GAGTTACCGGGATTTAAGAAGCGCCTCCGCCA TTCGATA-3'。

**2.7 SteC 蛋白酶活性验证** 磷酸盐亲和凝胶电泳(Phos-tag-SDS-PAGE)是磷酸化蛋白组学中用来区分磷酸化蛋白与非磷酸化蛋白的技术<sup>[15]</sup>。Phos-tag 是一种在中性水溶液中特异性结合磷酸单酯离子的金属螯合物<sup>[16]</sup>,在 Phos-tag SDS-PAGE 电泳过程中与磷酸化蛋白的磷酸基团可逆性结合而降低其迁移速率,从而与非磷酸化蛋白质区别<sup>[17]</sup>。配制 Phos-tag SDS-PAGE 胶<sup>[18]</sup>,设置对照组与 SteC 自磷酸化组<sup>[19]</sup>。SteC 自磷酸化体系:10× buffer 1 μL, SteC<sub>227-305</sub> 加入量根据蛋白浓度确定,加 H<sub>2</sub>O 补充至 10 μL,10 mmol/L ATP 1 μL,100 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1 μL,1 mol/L DTT 1 μL。对照组体系:10× buffer 1 μL,SteC<sub>227-305</sub> 加入量根据蛋白浓度确定,H<sub>2</sub>O 补充至 10 μL,100 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1 μL,1 mol/L DTT 0.1 μL。将配制的修饰体系置于 37 °C 水浴箱反应 30 min 后加入 2× loading buffer 终止反应,使用 SDS-PAGE 胶与 Phos-tag 胶进行酶活性验证。

## 结 果

### 1 SteC 生物信息学分析

SteC 蛋白全长 457 个氨基酸,等电点(pI)为 5.2,属于 PKc-like 超家族(图 1)。通过查询 PDB 数据库发现 SteC 不存在同源结构。根据 SteC-fl 蛋白预测的三级结构可将其简单分为两个结构域即 N 端非激酶结构域和 C 端催化结构域(图 2)。蛋白质的磷酸化通常发生在丝/苏氨酸及酪氨酸残基,而 SteC 作为一种激酶在对底物进行磷酸化的过程中其自身也经历着磷酸化过程<sup>[10]</sup>。利用 NetPhos 网址对 SteC 蛋白的磷酸化位点进行预测,结果如图 3。SteC 蛋白序列中含有 41 个磷酸化位点,其中 S80、Y110、T134、Y179、Y199、S201、S270、Y284、S297、T402、Y412、T445 无特异激

酶预测结果,推测以上位点可能是 SteC 蛋白的自磷酸化位点,而其他磷酸化位点可被 PKA、INSR、PKC、CKII 等激酶磷酸化。以上自磷酸化位点有 8 个位于 C 端催化结构域,结合 SteC-C 三级结构预测结果分析显示 T402、Y412、T445 位于 C 末端(图 4),可能在 SteC 的磷酸化过程中发挥重要作用。为了研究激酶的活性,选择截取 SteC-C 端催化结构域(194aa-457aa),其相对分子质量为  $29.74747 \times 10^3$ ,由 264 个氨基酸组成,预测蛋白等电点(pI)为 5.30,该结构域片段不稳定系数为 48.36,提示该蛋白稳定性差。SteC 蛋白氨基酸组成见表 3。

表 3 SteC-C 蛋白氨基酸组成  
Table 3 The amino acids composition of SteC-C protein

氨基酸 Amino acid	数量 Number	频率(%) Frequency	氨基酸 Amino acids	数量 Number	频率(%) Frequency
丙氨酸 Ala	19	7.2	亮氨酸 Leu	19	7.2
精氨酸 Arg	15	5.7	赖氨酸 Lys	20	7.6
天冬酰胺 Asn	15	5.7	甲硫氨酸 Met	6	2.3
天冬氨酸 Asp	20	7.6	苯丙氨酸 Phe	8	3.0
半胱氨酸 Cys	1	0.4	脯氨酸 Pro	8	3.0
谷氨酰胺 Gln	12	4.5	丝氨酸 Ser	17	6.4
谷氨酸 Glu	24	9.1	苏氨酸 Thr	10	3.8
甘氨酸 Gly	16	6.1	酪氨酸 Tyr	9	3.4
组氨酸 His	6	2.3	缬氨酸 Val	20	7.6
异亮氨酸 Ile	19	7.2	色氨酸 Try	0	0.0

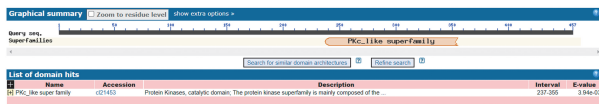


图 1 SteC-fl 蛋白保守结构域分析  
Fig. 1 Conservative domain analysis of SteC-fl protein

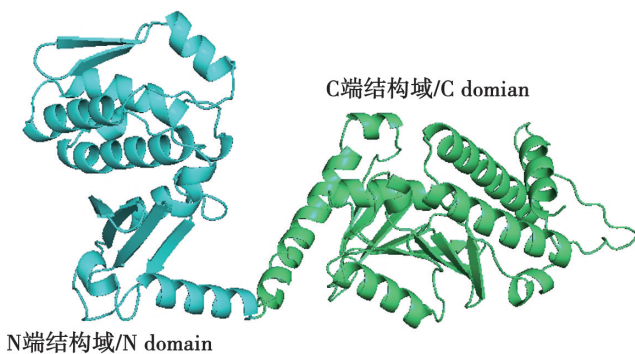


图 2 SteC fl 蛋白的三级结构预测  
Fig. 2 Prediction of tertiary structure of SteC fl protein

## 2 SteC His 标签融合蛋白表达菌株的构建及鉴定

鼠伤寒沙门菌效应蛋白 SteC-fl 及 SteC-C PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后大小为分别为 1371 bp、792bp(图 5),与预期结果一致。如图 6~7 所示,经 IPTG 诱导表达后通过 SDS-PAGE 电泳获得

相对分子质量为  $52.3 \times 10^3$  及  $29.3 \times 10^3$  的阳性表达菌株。对 2 号、3 号菌株进行测序,测序正确后命名为 SteC-fl、SteC-C。

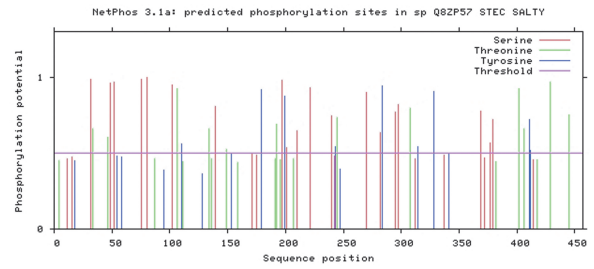


图 3 SteC 蛋白磷酸化位点预测  
Fig. 3 Prediction of phosphorylation sites of SteC protein

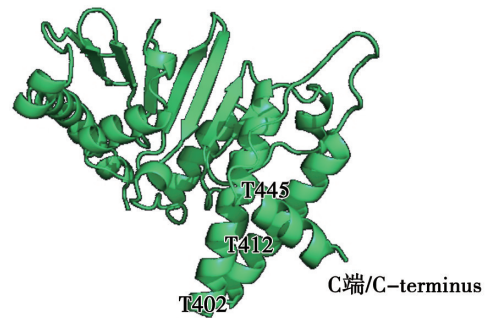
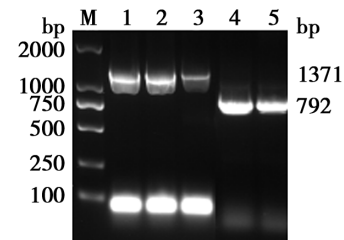


图 4 SteC-C 三级结构预测  
Fig. 4 Prediction of tertiary structure of SteC-C protein

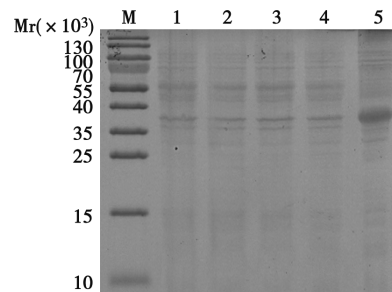


M DNA 标志物 1~3 SteC-fl PCR 产物 4、5 SteC-C PCR 产物

图 5 SteC-fl 及 SteC-C 基因 PCR 扩增结果

M DNA marker 1-3 SteC-fl PCR product 4-5 SteC-C PCR product

Fig. 5 PCR amplification result of SteC-fl gene and SteC-C gene

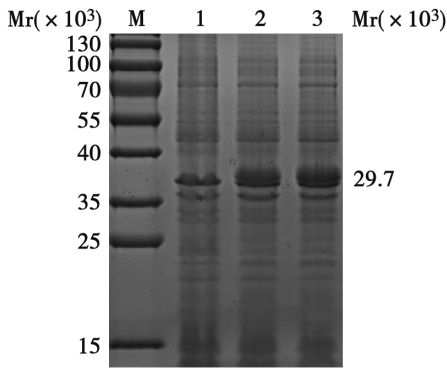


M 蛋白分子质量标准 1~4 SteC-fl 表达菌株 5 对照

图 6 SteC-fl 表达菌株的 test 结果

M Protein molecular 1-4 SteC-fl expression strain 5 control

Fig. 6 Test results of SteC-fl expression strains

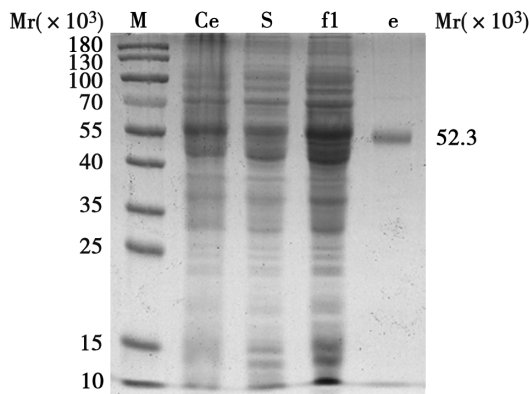


M 蛋白分子质量标准 1 对照 2,3 SteC-C 表达菌株  
图 7 SteC-C 表达菌株的 test 结果

M Protein molecular 1 Control 2,3 SteC-C expression strain  
Fig. 7 Test results of SteC-C expression strains

### 3 SteC His 标签融合蛋白的表达、纯化及鉴定

将测序正确的阳性表达菌株大量培养经过低温诱导后表达目的蛋白。通过 SDS-PAGE 蛋白胶对 Ni<sup>2+</sup> 柱纯化的 SteC-fl、SteC-C 蛋白及凝胶层析柱纯化的 SteC-C 蛋白性状进行分析,结果如图 8~11。其中 SteC-fl 表达量低且挂柱效果不好,可能是全长蛋白在诱导表达的过程中存在错误折叠造成蛋白与 His 标签结合减少,从而降低了蛋白的得率。SteC-C 蛋白表达量高于 SteC-fl,但在凝胶层析纯化过程中单体及二聚体均出现了降解的现象,提示 SteC-C 蛋白与预测结果一致,为不稳定蛋白。



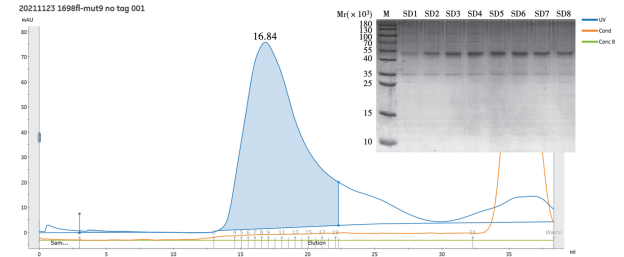
M 蛋白分子质量标准 Ce 超声破碎后全菌蛋白 S 超声破碎后表达菌上清液 fl 镍柱流穿液 e 镍柱洗脱的 His 标签融合蛋白  
图 8 SteC-fl His 标签融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

M Protein marker Ce Crude extraction S Protein of crushed supernatantfl Flow through e Elution  
Fig. 8 SDS-PAGE electrophoresis results of SteC-fl His labeled fusion protein

### 4 胰蛋白酶酶切及质谱分析

SteC-C 蛋白在纯化过程中的性质不稳定,因此用蛋白酶裂解的方法获取 SteC 蛋白性质稳定的片段,并将胰蛋白酶切后的样品进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 12,低浓度的胰蛋白酶即可将 SteC-C 分割出稳定的片段。选取干净部位的胶条切割(图 12 中标记的位

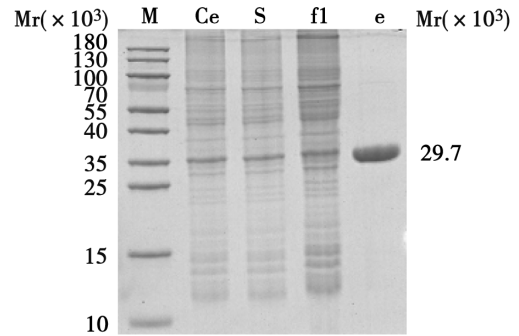
置)并利用 LM-MS/MS 鉴定肽段氨基酸序列,结果如表 4。肽段的第 227-305 位氨基酸为 SteC 的核心结构域。该结构域相对分子质量  $9.09 \times 10^3$ , pI 为 9.46, 稳定系数为 29.23(稳定蛋白),且此结构域中含有 PKc-like 结构域(图 13)。



M 蛋白分子质量标准 SD1-SD8 凝胶层析柱洗脱蛋白 7-14 管  
图 9 SteC-fl 凝胶层析柱纯化及电泳结果

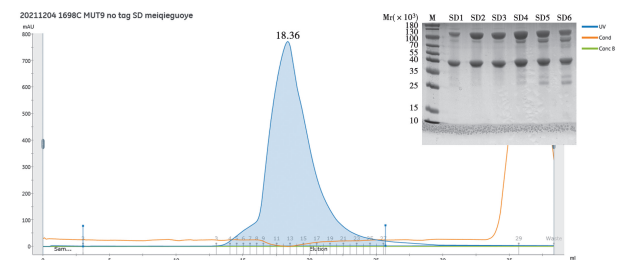
M Protein marker SD1-SD8 Eluting protein 7-14 tubes by gel chromatography column

Fig. 9 Purification results and electrophoresis results of SteC-fl by gel chromatography column



M 蛋白分子质量标准 Ce 超声破碎后全菌蛋白 S 超声破碎表达菌上清液 fl 镍柱流穿液 e 镍柱洗脱的 His 标签融合蛋白  
图 10 SteC-C His 标签融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

M Protein marker Ce Crude extraction S Protein of crushed supernatantfl Flow through e Elution  
Fig. 10 SDS-PAGE electrophoresis results of SteC-C His labeled fusion protein



M 蛋白分子质量标准 SD1-6 凝胶层析柱洗脱蛋白 11-16 管  
图 11 SteC-C 蛋白凝胶层析柱纯化及电泳结果

M Protein marker SD1-6 Eluting protein 11-16 tubes by gel chromatography column  
Fig. 11 Purification results and electrophoresis results of SteC-C by gel chromatography column

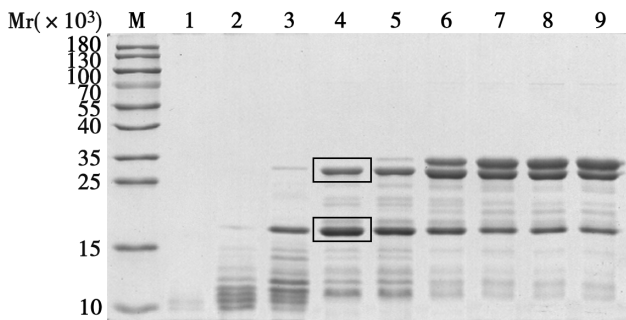
### 5 SteC 蛋白核心结构域的构建及纯化

SteC 蛋白核心区重组菌的构建及其蛋白纯化方

法同方法 2.2 和 2.3。如图 14 所示,SteC<sub>227-305</sub>PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定后大小为  $9.09 \times 10^3$ , 符合预期大小。经 IPTG 诱导表达后通过 SDS-PAGE 电泳获得阳性表达菌株并将 2 号、3 号菌株进行测序(图 15),测序正确的菌株命名为 SteC<sub>227-305</sub>。扩大培养表达菌株并使用 IPTG 低温诱导目的蛋白表达并进行 Ni<sup>2+</sup>柱纯化,纯化的 SteC<sub>227-305</sub> 经 SDS-PAGE 电泳分析其可溶性差且得率低,但稳定性优于 SteC-fl 和 SteC-C(图 16),与预测相符。

表 4 SteC 蛋白核心区肽段氨基酸序列质谱鉴定  
Table 4 Identification results of amino acid sequences in the core region of SteC proteins by LS-MS/MS

肽段氨基酸序列 Annotated Sequence	在蛋白序列中的位置 Positions in Master Protein	匹配到肽段的 质谱图总数 PMFs
K. DVTVLVSK. Y	306-313	13
K. IPVNER. G	256-262	146
K. IGSYSGTVYR. L	238-248	148
K. VDVNSPEHR. N	266-274	297
K. YLNMANDDK. N	284-292	76
K. YLNMANDDKNFSR. S	284-296	108
R. NCHPDR. V	273-280	38
R. LHDDFVVK. I	249-256	132
R. SAIMNINGK. D	297-305	25
R.	297-313	3
SAIMNINGKDVTVLVSK. Y	297-313	3
R. MRDIEK. N	230-235	13
R. QLEEQIK. A	384-390	8



M 蛋白分子质量标准 1~8 依次为 2、1、1/3、1/9、1/27、1/81、1/243、1/729 mg/mL 胰蛋白酶酶切产物 9 未酶切对照

图 12 SteC-C 胰蛋白酶酶切分析

M Protein marker 1-8 Enzymatic digestion with trypsin different concentrations (2, 1, 1/3, 1/9, 1/27, 1/81, 1/243, 1/729 mg/mL) 9 Control group

Fig. 12 SteC-C protein cleavage experiment

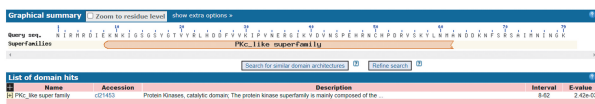


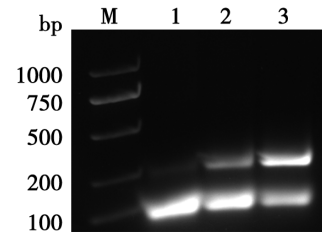
图 13 SteC 蛋白核心结构域分析

Fig. 13 Analysis of SteC protein core domain

## 6 SteC<sub>227-305</sub> 酶活性验证

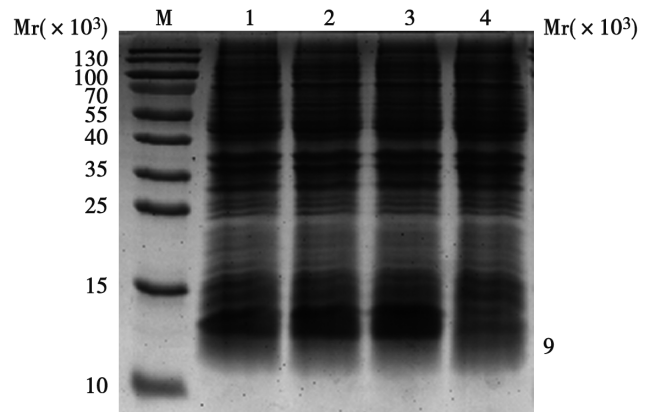
SDS-PAGE 胶分析显示,SteC<sub>227-305</sub> 条带清晰且大

小位置正确。Phos tag 复合胶分析显示,SteC<sub>227-305</sub> 具有较弱的自磷酸化活性(图 17)。结合生物信息学预测磷酸化的结果,S270、Y284、S297 可能不是 SteC 关键的自磷酸化位点。



M DNA 标志物 1~3 SteC<sub>227-305</sub> PCR 产物  
图 14 SteC<sub>227-305</sub> 基因 PCR 扩增结果

M DNA marker 1-3 SteC<sub>227-305</sub> PCR product  
Fig. 14 PCR amplification result of SteC<sub>227-305</sub> gene

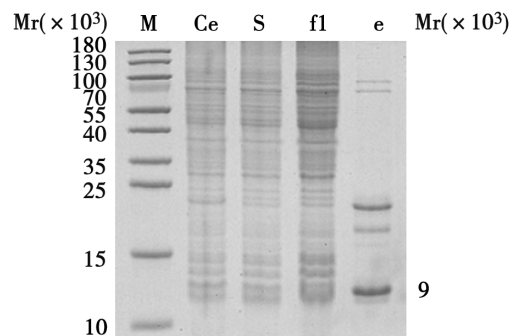


M 蛋白分子质量标准 1~3 SteC<sub>227-305</sub> 表达菌株 4 对照

图 15 SteC<sub>227-305</sub> 表达菌株鉴定结果

M Protein marker 1-3 SteC<sub>227-305</sub> expression strain 4 Control

Fig. 15 Identification results of SteC<sub>227-305</sub> expressing strain



M 蛋白分子质量标准 Ce 重组菌超声破碎全菌蛋白 S 重组菌超声破碎上清液 e 镍柱洗脱的 His 标签蛋白

图 16 SteC<sub>227-305</sub> 标签融合蛋白 Ni<sup>2+</sup> 柱提纯结果

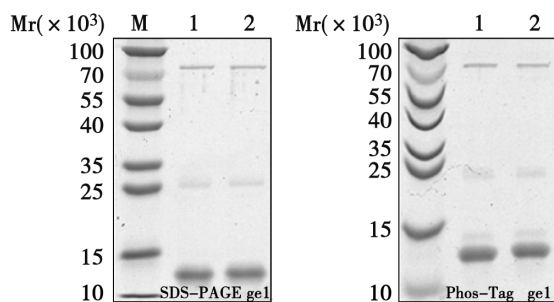
M Protein marker Ce Crude extraction S Protein of crushed supernatant e Flow through

Fig. 16 Purification results of SteC<sub>227-305</sub> label fusion protein by Ni<sup>2+</sup> Column

## 讨论

在与宿主相互作用的过程中,植物和动物的细菌

病原体已经进化出专门的蛋白运输系统即 T3SS<sup>[20]</sup>, 该系统将分泌的效应蛋白运输到宿主细胞中, 参与调节各种细胞的活动。T3SS 最初在鼠伤寒沙门菌中被发现, 其介导分泌的效应蛋白在宿主的免疫逃逸及致病过程中具有不同作用<sup>[21]</sup>。鼠伤寒沙门菌入侵宿主肠道上皮细胞后首先激活致病岛 1 (SPI-1) 编码的 T3SS 通过传递多种效应蛋白刺激宿主细胞的反应, 导致细菌的内化和被感染细胞的转录重编辑, 从而引发炎症反应。为了在宿主细胞内生存和复制, 鼠伤寒沙门菌通过 SPI-2 编码的 T3SS 分泌多种效应蛋白来调节囊泡 (SCV) 的运输, 以避免宿主的先天免疫反应。SPI-2 T3SS 分泌的效应蛋白也有被证实或预测为酶类或具有酶的功能<sup>[22]</sup>。SseL 是一种去泛素化酶, 可抑制胞质聚集物的自噬清除, 诱导晚期巨噬细胞死亡。SpvB 是一种 ADP-核糖基转移酶可抑制肌动蛋白的聚合, 促进巨噬细胞凋亡。SspH2 是 E3 泛素连接酶一员, 可增强 Nod 1 的应答。而 SPI-2 T3SS 分泌的效应蛋白 SteC 表现出特有的性质, 在蛋白质磷酸化中发挥重要作用。研究发现, 细菌中多肽的翻译后修饰特别是蛋白质磷酸化 (PTM), 是几乎所有物种代谢调节的主要机制, 而这种 PTM 是由被称为磷酸转移酶或蛋白激酶催化产生的<sup>[23]</sup>。效应蛋白 SteC 作为一种激酶可使 MAP 激酶磷酸化以诱导 SCV 周围肌动蛋白的形成<sup>[13]</sup>, 也直接磷酸化 FMNL1 蛋白<sup>[12]</sup>。鼠伤寒沙门菌入侵人上皮细胞 (Hela) 和小鼠巨噬细胞 (RAW 264.7) 细胞后可表现出不同的生存能力。当 SteC 缺失菌株入侵 RAW264.7 巨噬细胞后, 与野生菌株相比复制水平显著降低, 表明 SteC 影响鼠伤寒沙门菌在巨噬细胞内的生存。而 SteC 缺失菌株入侵 Hela 细胞时复制水平无明显变化, 说明 SteC 在上皮细胞中发挥的作用较小<sup>[24]</sup>。尽管 SteC 已被证实为激酶, 但其磷酸化机制尚不明确。



M 蛋白分子质量标准 1 对照组 2 SteC<sub>227-305</sub> 自磷酸化修饰组  
图 17 SteC<sub>227-305</sub> 酶活性测定  
M Protein marker 1 Control group 2 SteC<sub>227-305</sub> self phosphorylation modification group

Fig. 17 Enzyme activity assay of SteC<sub>227-305</sub>

本研究利用生物信息学方法对 SteC 蛋白进行分

析, 该蛋白属于蛋白激酶家族的一员, 并且含有 PKc-like 超家族。对 SteC 的磷酸化位点进行预测, 结果显示 S80、Y110、T134、Y179、Y199、S201、S270、Y284、S297、T402、Y412、T445 不存在特异性激酶的修饰, 可能为 SteC 潜在的自磷酸化位点。构建 SteC 原核表达体系, 表达的 SteC-fl 蛋白在折叠过程中存在问题而其 C 端催化结构域蛋白性质不稳定。为了寻找 SteC 蛋白相对稳定的区域, 通过胰蛋白酶切试验、LM-MS 鉴定及蛋白的层析纯化确定 SteC<sub>227-305</sub> 是一个含有 PKc-like 超家族的较小的结构域且蛋白性质稳定, 但可溶性差, 不利于 SteC 蛋白晶体的培养。利用 Phos-tag 复合胶进行酶活性实验, 显示 SteC<sub>227-305</sub> 具有较弱的自磷酸化功能, 说明 S270、Y284、S297 不是 SteC 关键的自磷酸化位点。因此, 通过磷酸化质谱分析进一步探究 SteC 关键的自磷酸化位点, 并通过 Phos-tag 复合胶验证其活性, 可为阐述 SteC 催化磷酸化的机制奠定基础。

【参考文献】

[1] Rivera-Chavez F, Baumlmer AJ. The pyromaniac inside you: *Salmonella* metabolism in the host gut [J]. Annu Rev Microbiol, 2015(69):31-48.  
[2] Galán JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells [J]. Science, 1999 (284):1322-1328.  
[3] 张丽, 邵峰. 病原菌效应蛋白翻译后修饰宿主免疫防御通路 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2014, 41(10):1047-1055.  
[4] Imami K, Bhavsar AP, Y Hb, et al. Global impact of *Salmonella* pathogenicity island 2-secreted effectors on the host phosphoproteome [J]. Mol Cell Proteomics, 2013 (12): 1632-1643.  
[5] Hanks SK. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective [J]. Genome Biol, 2003; 4(5):111.  
[6] Uezato Y, Kameshita I, Morisawa K, et al. A method for profiling the phosphorylation state of tyrosine protein kinases [J]. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom, 2019(1867):71-75.  
[7] Cozzone AJ. ATP-dependent protein kinases in bacteria [J]. J Cell Biochem, 1993(51):7-13.  
[8] Cozzone AJ, Grangeasse C, Doublet P, et al. Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria [J]. Arch Microbiol, 2004(181):171-181.  
[9] Poh J, Odendall C, Spanos A, et al. SteC is a *Salmonella* kinase required for SPI-2-dependent F-actin remodelling [J]. Cell Microbiol, 2008, 10(1):20-30.  
[10] Heggie A, Cerny O, Holden DW. SteC and the intracellular *Salmonella*-induced F-actin meshwork [J]. Cell Microbiol, 2021 (23):e13315.  
[11] Odendall C, Rolhion N, Forster A, et al. The *Salmonella* kinase SteC targets the MAP kinase MEK to regulate the host actin cytoskeleton [J]. Cell Host Microbe, 2012(12):657-668.

(下转 661 页)

- attenuation for mice[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25486.
- [3] Filippov AA, Sergueev KV, Nikolich MP. Can phage effectively treat multidrug-resistant plague? [J]. Bacteriophage, 2012, 2(3): 186-189.
- [4] Barbieri R, Signoli M, Cheve D, et al. *Yersinia pestis*: the natural history of plague [J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 34(1): e00044-19.
- [5] Cisek AA, Dbrowska I, Gregorczyk KP, et al. Phage therapy in bacterial infections treatment: One hundred years after the discovery of Bacteriophages [J]. Curr Microbiol. 2017, 74(2): 277-283.
- [6] Abdelsattar A, Dawoud A, Makky S, et al. Bacteriophages: from Isolation to Application [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2022, 23(3): 337-360.
- [7] 袁月. 一株分离自剑川鼠疫疫源地中鼠噬菌体生物学及基因组学特性的研究[D]. 昆明医科大学, 2020.
- [8] 赵丹妮. 三株分离自云南松鼠中的鼠噬菌体生物学特性及基因组学研究[D]. 大理大学, 2021.
- [9] 张志宏, 杨娇, 王鹏, 等. 一株金黄色葡萄球菌噬菌体的裂解谱特异性及分子分类研究[J]. 微生物学报, 2021, 61(7): 2043-2052.
- [9] Prevelige PE Jr, Cortines JR. Phage assembly and the special role of the portal protein [J]. Curr Opin Virol, 2018(31): 66-73.
- [10] 陈躬浩, 付汉清, 童桂香, 等. 一株新型溶藻弧菌噬菌体  $\phi$ V039C 的生物学特性和全基因组分析 [J]. 集美大学学报(自然科学版), 2021, 26(5): 398-407.
- [11] Liang J, Qin S, Duan R, et al. A lytic *Yersinia pestis* bacteriophage obtained from the bone marrow of *Marmota himalayana* in a plague-focus area in China [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021(11): 700322.
- [12] Walch P, Selkirk J, Knodler LA, et al. Global mapping of *Salmonella* enterica-host protein-protein interactions during infection [J]. Cell Host Microbe, 2021(29): 1316-1332. e12.
- [13] Correia SS, Bischler T, Westermann AJ, et al. MAPS integrates regulation of actin-targeting effector SteC into the virulence control network of *Salmonella* small RNA PinT [J]. Cell Rep, 2021(34): 108722.
- [14] 杨银龙, 岳盈盈, 宋楠楠, 等. 鼠伤寒沙门菌 AvrA 蛋白的原核表达及纯化 [J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(12): 1305-1309.
- [15] Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T. History of Phos-tag technology for phosphoproteomics [J]. J Proteomics, 2022(252): 104432.
- [16] Nagy Z, Comer S, Smolenski A. Analysis of protein phosphorylation using Phos-Tag Gels [J]. Curr Protoc Protein Sci, 2018(93): e64.
- [17] 李阳, 李玉红. Phos-tag 技术在磷酸化蛋白质组学中的应用 [J]. 生命的化学, 2010, 30(1): 145-148.
- [18] Markandran K, Xuan JVLE, Yu H, et al. Mn<sup>2+</sup>-Phos-Tag polyacrylamide for the quantification of protein phosphorylation levels [J]. Curr Protoc, 2021(1): e221.
- [19] 高昆. 大肠杆菌蛋白激酶 YihE 的作用靶标及参与的细胞途径 [D]. 云南大学, 2020.
- [12] 叶玲玲. 鹤庆野鼠鼠疫疫源地犬中噬菌体的分离鉴定、生物学特性及基因组研究 [D]. 大理大学, 2020.
- [13] Xiang Y, Li W, Song F, et al. Biological characteristics and whole-genome analysis of the *Enterococcus faecalis* phage PEf771 [J]. Can J Microbiol, 2020, 66(9): 505-520.
- [14] Xu J, Zhang R, Yu X, et al. Molecular characteristics of novel phage  $\nu$ B<sub>-</sub>ShiP-A7 infecting multidrug-resistant *Shigella flexneri* and *Escherichia coli*, and its bactericidal effect *in vitro* and *in vivo* [J]. Front Microbiol, 2021(12): 698962.
- [15] Pan L, Li D, Sun Z, et al. First characterization of a hafia phage reveals extraordinarily large burst size and unusual plaque polymorphism [J]. Front Microbiol, 2022(12): 754331.
- [16] Roy A, Bhardwaj A, Datta P, et al. Small terminase couples viral DNA binding to genome-packaging ATPase activity [J]. Structure, 2012, 20(8): 1403-1413.
- [17] Filippov AA, Sergueev KV, He Y, et al. Bacteriophages capable of lysing *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*: efficiency of plating tests and identification of receptors in *Escherichia coli* K-12 [J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 95(4): 123-134.
- [18] 王波. 鹤庆野鼠鼠疫疫源地鼠噬菌体的分离、生物学特性及基因组研究 [D]. 昆明医科大学, 2019.
- [19] 钟佑宏, 苏超, 吴鹤松, 等. 云南家鼠鼠疫疫源地指示动物中鼠噬菌体分离及其流行病学意义 [J]. 中华地方病学杂志, 2019(11): 861-867.
- [20] 钟佑宏, 赵丹妮, 段存娟, 等. 一株分离自丽江野鼠鼠疫疫源地鼠噬菌体裂解特性的研究 [J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(08): 839-842.
- 【收稿日期】 2022-12-20 【修回日期】 2023-03-11
- 
- (上接 656 页)
- [12] Walch P, Selkirk J, Knodler LA, et al. Global mapping of *Salmonella* enterica-host protein-protein interactions during infection [J]. Cell Host Microbe, 2021(29): 1316-1332. e12.
- [13] Correia SS, Bischler T, Westermann AJ, et al. MAPS integrates regulation of actin-targeting effector SteC into the virulence control network of *Salmonella* small RNA PinT [J]. Cell Rep, 2021(34): 108722.
- [14] 杨银龙, 岳盈盈, 宋楠楠, 等. 鼠伤寒沙门菌 AvrA 蛋白的原核表达及纯化 [J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(12): 1305-1309.
- [15] Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T. History of Phos-tag technology for phosphoproteomics [J]. J Proteomics, 2022(252): 104432.
- [16] Nagy Z, Comer S, Smolenski A. Analysis of protein phosphorylation using Phos-Tag Gels [J]. Curr Protoc Protein Sci, 2018(93): e64.
- [17] 李阳, 李玉红. Phos-tag 技术在磷酸化蛋白质组学中的应用 [J]. 生命的化学, 2010, 30(1): 145-148.
- [18] Markandran K, Xuan JVLE, Yu H, et al. Mn<sup>2+</sup>-Phos-Tag polyacrylamide for the quantification of protein phosphorylation levels [J]. Curr Protoc, 2021(1): e221.
- [19] 高昆. 大肠杆菌蛋白激酶 YihE 的作用靶标及参与的细胞途径 [D]. 云南大学, 2020.
- [20] Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, et al. Supramolecular structure of the *Salmonella* typhimurium type III protein secretion system [J]. Science, 1998; 280(5363): 602-605
- [21] Gal n JE, Lara-Tejero M, Marlovits TC, et al. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells [J]. Annu Rev Microbiol, 2014(68): 415-438.
- [22] Jennings E, Thurston TLM, Holden DW. *Salmonella* SPI-2 Type III secretion system effectors: molecular mechanisms and physiological consequences [J]. Cell Host Microbe, 2017, 22(2): 217-231.
- [23] Zhang A, Pompeo F, Galinier A. Overview of protein phosphorylation in bacteria with a main focus on unusual protein kinases in *Bacillus subtilis* [J]. Res Microbiol. 2021, 172(7-8): 103871.
- [24] Buckner MM, Croxen MA, Arena ET, Finlay BB. A comprehensive study of the contribution of *Salmonella* enterica serovar *Typhimurium* SPI2 effectors to bacterial colonization, survival, and replication in typhoid fever, macrophage, and epithelial cell infection models [J]. Virulence, 2011; 2(3): 208-216.
- 【收稿日期】 2022-12-11 【修回日期】 2023-03-01