

2型猪链球菌低分子量酪氨酸磷酸酶的制备及酶学研究

吴倩倩^{1,2},潘秀珍^{1,2},李超龙²,侯红芬²,王长军²,高基民^{1,2}

摘要:目的 表达纯化2型猪链球菌(*Streptococcus suis* 2,SS2)低分子量酪氨酸磷酸酶(Low molecular weight protein tyrosine phosphatase,LMW-PTP),测定LMW-PTP磷酸酶活性并鉴定其酶活性位点,为后续的功能鉴定奠定基础。方法 分别构建野生型LMW-PTP基因表达质粒pET28a;LMW-PTP、突变型LMW-PTP基因表达质粒pET28a;LMW-PTPC33A和pET28a;LMW-PTPR39A,重组质粒转化 *E.coli* BL21(DE3),筛选阳性转化子,通过IPTG诱导表达后经SDS-PAGE鉴定表达产物。镍柱亲和层析纯化得到重组蛋白经Western blot鉴定,野生型LMW-PTP免疫新西兰兔制备兔多克隆抗体。以对硝基苯酚二钠六水(PNPP-Na)为底物检测重组蛋白的磷酸酶活性。**结果** 成功构建野生型LMW-PTP基因表达质粒pET28a;LMW-PTP、突变型LMW-PTP基因表达质粒pET28a;LMW-PTPC33A、pET28a;LMW-PTPR39A,在大肠杆菌中野生型和突变型LMW-PTP均以包涵体的形式存在,相对分子量为23 kDa,包涵体经镍柱纯化及透析复性获得纯度较高的野生型和突变型LMW-PTP。制备得到的抗LMW-PTP的兔多克隆抗体的效价为1:102 400,且重组蛋白均能与His-Tag单抗和兔多抗血清发生反应。对野生型蛋白进行磷酸酶活性检测显示其具有酶活性,酶活为2.1 nmol/(min·μg),突变型LMW-PTPC33A、LMW-PTPR39A无磷酸酶活性。**结论** 成功表达了具有磷酸酶活性的LMW-PTP,并鉴定出Cys³³和Arg³⁹是LMW-PTP的活性位点。为后续寻找LMW-PTP在2型猪链球菌致病过程中毒力相关的靶蛋白奠定了基础。

关键词:2型猪链球菌;低分子量酪氨酸磷酸酶;原核表达

中图分类号:R378.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2018)07-0588-07

Purification and enzyme activity assay of low molecular weight protein tyrosine phosphatase

WU Qian-qian^{1,2}, PAN Xiu-zhen^{1,2}, LI Chao-long², HOU Hong-fen², WANG Chang-jun², GAO Ji-min^{1,2}

(1. College of Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China;

2. Institute of Military Medical Science, Nanjing Command, Nanjing 210002, China)

Abstract: To measure the enzymatic activity of *Streptococcus suis* 2 LMW-PTP and identify its active site, *Streptococcus suis* 2 LMW-PTP was expressed and purified. The wild type LMW-PTP gene expression plasmid pET28a;LMW-PTP and two mutant types LMW-PTP gene expression plasmid pET28a;LMW-PTPC33A and pET28a;LMW-PTPR39A were constructed, and transformed *E. coli* strain BL21 for protein expression. IPTG induced-positive transformants were analyzed by SDS-PAGE, which revealed that the recombinant protein with an apparent molecular mass of 23 kDa was expressed as inclusion body in *E. coli* strain BL21. After denaturing in urea, gradient dialysis, the recombinant protein with high purity was obtained. Polyclonal antibodies against LMW-PTP was prepared by immunizing New Zealand rabbits. The titer of the polyclonal antibodies against LMW-PTP was 1:102 400. The recombinant protein can respectively react with the His-Tag antibody and rabbit serum against LMW-PTP. Phosphatase assay was performed, which showed that the phosphatase activity of LMW-PTP was 2.1 nmol/(min·μg), but the mutant protein had no enzymatic. These results demonstrated that LMW-PTP is a phosphatase and that this activity is dependent on the Cys³³ and Arg³⁹ residues, which laid the foundation for further determine the LMW-PTP-related target protein in the pathogenesis of *Streptococcus suis* type 2.

国家自然科学基金(No.81571965,81172794,81071317);江苏省自然科学基金项目(No.BK20151091);江苏省333工程科研资助项目(No.BRA2014363)

吴倩倩,潘秀珍并列第一作者。

通讯作者:高基民,Email:jiminggao@yahoo.com

作者单位:1.温州医科大学检验医学院生命科学学院,温州325000;

2.南京军事医学研究所,南京 210002

Keywords: *Streptococcus suis* 2; low molecular weight

protein tyrosine phosphatase; purification

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.81571965,81172794,81071317); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province(No.BK20151091); the 333 Engineering Science Foundation of Jiangsu Province(No.BRA2014363)
Corresponding author; Gao Ji-min, Email:jiminggao@yahoo.com

猪链球菌(*Streptococcus suis*)是一种重要的人兽共患病病原体,人可通过接触患病动物或受污染的生猪肉产品而被感染。猪链球菌感染人可引起人患脑膜炎、败血症、关节炎、甚至链球菌中毒性休克综合征(Streptococcal toxic shock syndrome)^[1-4]。根据荚膜抗原的不同,可将猪链球菌分为33个血清型^[5-6],其中2型猪链球菌毒力最强,临床检出率最高^[5],虽然近二十年来对2型猪链球菌(*Streptococcus suis* 2,SS2)的研究已不断深入,但对其致病机制和毒力因子的认识仍有待探索^[6]。

真核生物酪氨酸磷酸化由蛋白酪氨酸激酶(Protein tyrosine kinase, PTKs)和酪氨酸磷酸酶(Protein Tyrosine Phosphatase, PTPs)调控,酪氨酸磷酸化在真核细胞的生长、迁移、增殖、分化和免疫应答发挥重要作用^[8]。研究发现在原核生物中也分离出PTKs和PTPs的类似物^[9-10],并且在细菌的生物功能中发挥重要作用。在蛋白磷酸化与去磷酸化的动态平衡中,PTPs在其中发挥的作用不可忽视,LMW-PTP作为PTPs的一种,其磷酸酶结构高度保守,同所有的PTPs家族的其它成员类似,含有CX₅R序列标签^[11-12]。目前已经发现LMW-PTP在细菌中发挥多种作用,如鼠疫杆菌的YopH影响肌动蛋白重组^[13],大肠杆菌的Wzb参与荚膜多糖的合成^[14],结核分支杆菌的MptpB,MptpB参与宿主感染^[15-16]。而LMW-PTP在2型猪链球菌中的作用并未有报道。

本课题组前期已完成了2型猪链球菌05ZYH33全基因组测序和注释^[17]。通过基因组注释分析发现SSU05_1691编码LMW-PTP。本文以2型猪链球菌LMW-PTP为研究对象,通过原核表达获得了具有磷酸酶活性的LMW-PTP,为寻找LMW-PTP在强毒株2型猪链球菌中的靶蛋白鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、引物 2型猪链球菌05ZYH33、表达质粒pET28a由本实验室保存,宿主菌 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3)购自全式金生物技术有限公司,引物由上海赛百盛公司合成,碱基序列如

表1 引物碱基序列

Tab.1 Primer sequence

引物名称	引物序列(5'-3')
LMW-PTP-F	GGAATTCCATATGATG-CAAGAGAGGGAACTCA(<i>Nde</i> I)
LMW-PTP-R	CCGCTCGAGTTCTTGATCAAAT-GACTGTAAC(<i>Xho</i> I)
LMW-PT-PC33A-F	AAATCGTTTTGTCGCTCTTG-GAAATATTGTCGTA(Cys \rightarrow Ser)
LMW-PT-PC33A-R	TACGACAAATATTCCAAGAGCGA-CAAAAACGATT(Cys \rightarrow Ser)
LMW-PT-PC33A-F	TTGTCTGTCTTGGAAATATTGTCGCTATGG(Arg \rightarrow Ser)
LMW-PT-PC33A-R	CCATAGGGCTAGCACAATATTCAAGACAGACAA(Arg \rightarrow Ser)

表1。

1.2 试剂 PCR扩增试剂盒、250 bp DNA Ladder Marker、限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I、T4连接酶购自TAKARA;质粒提取试剂盒、卡那霉素、IPTG、对硝基苯酚二钠六水购自生工;PageRuler Prestained Protein Ladder ECL化学发光试剂盒购自Thermo;scientific His-Tag单克隆抗体,HRP标记的羊抗鼠,IgG HRP标记的羊抗兔 IgG 购自博奥森;弗氏完全佐剂和不完全佐剂购自sigma公司;Ni离子亲和层析柱购自南京金斯瑞;TMB显色液购自上海碧云天;酶标板购自美国康宁。

1.3 动物 新西兰雌性兔(2.0 kg)购于南京金陵种兔场。

1.4 LMW-PTP生物信息学分析 利用BLAST在线分析工具搜索LMW-PTP蛋白同源序列,用Clustalx软件将LMW-PTP与其同源蛋白序列进行比对分析。

1.5 LMW-PTP重组表达质粒的构建及定点突变用引物对LMW-PTP-F/R扩增05ZYH33 LMW-PTP目的片段。PCR反应体系(25 μ L):ddH₂O 18.3 μ L, 10 \times PCR buffer(Mg²⁺) 2.5 μ L, dNTP Mixture 2 μ L, 上游引物 0.5 μ L, 下游引物 0.5 μ L, Ex Taq DNA聚合酶 0.2 μ L, 模板 1 μ L。PCR扩增条件:94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 30

s, 共 30 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min。PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析。将扩增片段和 pET28a 分别用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 酶切产物割胶回收后用 T4 DNA Ligase 16 ℃ 水浴过夜连接, 连接产物转化 DH5 α 感受态, 菌液 PCR 验证的阳性菌提质粒, 用 *Nde* I 和 *Xho* I 做双酶切鉴定, 经测序验证构建成功的克隆质粒命名为 pET28a: LMW-PTP。以重组质粒 pET28a: LMW-PTP 为 PCR 模板, 用引物对 LMW-PTPC33A-F/R, LMW-PTPR39A-F/R 分别进行 PCR 扩增, PCR 反应体系 (50 μ L): 质粒模板 50 ng, 正向突变引物 2 μ L, 反向突变引物 2 μ L, 5 \times FastAlteration Buffer 10 μ L, FasteAlteration DNA Polymerase 1.5 μ L, RNase-Free ddH₂O 加至 50 μ L。PCR 扩增条件: 95 ℃ 2 min 1 个循环, 94 ℃ 20 s, 60 ℃ 10 s, 68 ℃ 2.5 min, 共 18 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析。将 45 μ L 的 PCR 产物与 1 μ L 的 *Dnp*I 限制性内切酶混匀, 于 37 ℃ 水浴锅消化 1 h。取 5 μ L 消化产物转化 FDM 感受态, 突变型质粒鉴定参照野生型质粒, 构建成功的克隆质粒分别命名为 pET28a: LMW-PTPC33A 和 pET28a: LMW-PTPR39A。

1.6 重组蛋白 LMW-PTP 的诱导表达纯化 将野生型 pET28a: LMW-PTP 及突变型 pET28a: LMW-PTPC33A, pET28a: LMW-PTPR39A 分别转化 BL21 (DE3) 感受态, 筛选的阳性转化子 pET28a: LMW-PTP/BL21、pET28a: LMW-PT-PC33A/BL21、pET28a: LMW-PTPR39A/BL21 分别接种于含 kana 抗性的新鲜 LB 液体培养基中过夜培养, 再分别以 1:50 接种于含 kana 抗性的新鲜 LB 液体培养基中, 37 ℃、200 r/min 震荡培养至 OD₆₀₀≈0.6 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 ℃ 继续诱导 4 h, 6 000 r/min, 4 ℃ 离心 10 min 收菌, PBS 洗涤 3 次后重悬菌体并冰浴超声, 12 000 r/min, 4 ℃ 离心 15 min 分离上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 分析。经鉴定野生型蛋白和突变型蛋白均以包涵体形式表达, 将包涵体溶解于适量的 8 mol/L 脲 (含 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, 5% 甘油, pH 8.0) 中, 用 0.22 μ m 滤膜过滤后经镍离子亲和层析柱纯化获得重组蛋白 LMW-PTP, 咪唑梯度洗脱的包涵体经 3 kD 的超滤浓缩管浓缩, 用 6 mol/L、4 mol/L、2 mol/L、0 mol/L 脲透析液梯度透析 10% SDS-PAGE 鉴定重组蛋白的诱导及纯化。

1.7 LMW-PTP 多抗兔血清的制备, 效价测定及特

异性鉴定 在免疫之前, 耳缘静脉取兔血清做阴性对照, 初次免疫: 将纯化后的 LMW-PTP (400 μ g/只) 与等体积的弗氏完全佐剂乳化, 皮下多点注射免疫新西兰兔。2 周后以相同剂量的蛋白与等体积的弗氏不完全佐剂等体积乳化免疫 2 次, 每 3 周 1 次, 最后不加佐剂直接多点注射蛋白加强免疫, 一周后耳缘静脉取血, ELASA 测效价。重组蛋白 10 μ g/mL 包被 ELISA 96 孔板, 每孔 100 μ L, 置于 4 ℃ 过夜包被, TBST 洗板 3 次, 每孔加入 100 μ L 3% BSA 封闭 1 h, TBST 洗 3 次后, 每孔加入用 1% BSA 稀释的血清, 阴性兔血清和免疫兔血清均以 1:100 开始倍比稀释, 孵育 1 h 后 TBST 洗 3 次, 每孔加入用 1% BSA 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG (1:5 000), 孵育 1 h 后加 TMB 显色液显色, 5 min 后加入 2 N H₂SO₄ 终止显色, 酶标仪检测 A₄₅₀ 值。P/N>2.1 为阳性。将重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 采用电转印迹 (湿转, 恒流 300 mA) 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 膜分别于 His-Tag 单克隆抗体 (1:1 000) 和兔多抗血清 (1:8 000) 孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 将膜分别于 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:5 000) 和 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:9 000) 孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加 ECL 化学发光显色。

1.8 LMW-PTP 酶学性质测定 参照文献 [18] 以对硝基苯磷酸盐 (PNPP) 为底物测定 LMW-PTP 的磷酸酶活性。LMW-PTP 酶活性定义每分钟每毫克的酶蛋白作用于底物 PNPP 所释放 Pi 的纳摩尔数 nmol/(min · μ g)。通过对酶促反应的 pH、温度、时间、蛋白量等进行条件优化后, 以 100 mmol/L 的柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.5) 为酶反应液, 1.5 μ g 的 LMW-PTP 催化 20 mmol/L 的 PNPP 水解成 PNP, 37 ℃ 反应 15 min, 3 N NaOH 终止反应, 在 405 nm 下测定产物的吸光度值, PNP 的摩尔消光系数为 18.75 mmol⁻¹ cm⁻¹, 酶活性计算公式为:

$$\text{酶活性 nmol}/(\text{min} \cdot \mu\text{g}) = (\text{OD}_{405} \times V) / (\epsilon \times T \times L \times E)$$

V 代表反应体积 μ L, ϵ 代表 PNP 的消光系数 mmol/L cm⁻¹, T 代表孵育时间 min, L 代表光程 cm, E 代表酶量 μ g

同时绘制标准曲线, 分别配置不同浓度的 PNP 标准溶液 3 mmol/L、6 mmol/L、9 mmol/L、12 mmol/L、15 mmol/L、18 mmol/L, 在 405 nm 处测定 PNP 的吸光度值。酶促反应在终体积为 100 μ L 的 100 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液中进行, 1.5 μ g 的

LMW-PTP 催化不同浓度的 PNPP 发生水解反应, 37 ℃反应 15 min, 3 N NaOH 终止反应, 测定 A₄₀₅, 重复 3 次。测定结果利用双倒数法(Lineweaver-Burk)作图, 横轴截距为-1/Km, 由此可求得 Km 值。

1.9 突变型蛋白酶活性与野生型蛋白酶活的测定
100 mmol/L 的柠檬酸盐缓冲液, 野生型的 LMW-PTP, 突变型 LMW-PTPC33A, LMW-PTPR39A 重组蛋白各 1.5 μg 分别与不同浓度的 PNPP 反应, 37

℃反应 15 min, 测定 A₄₀₅。

2 结 果

2.1 LMW-PTP 生物信息学分析 经 BLAST 检索同源发现, LMW-PTP 与肺炎链球菌、无乳链球菌、结核分枝杆菌等细菌对应的蛋白相似度在(50% ~ 68%)。经 Clustalx 软件比对发现所有的 PTP 蛋白序列均有保守的 N 末端催化结构域(FVC(X5)RSPMAE)(图 1)。

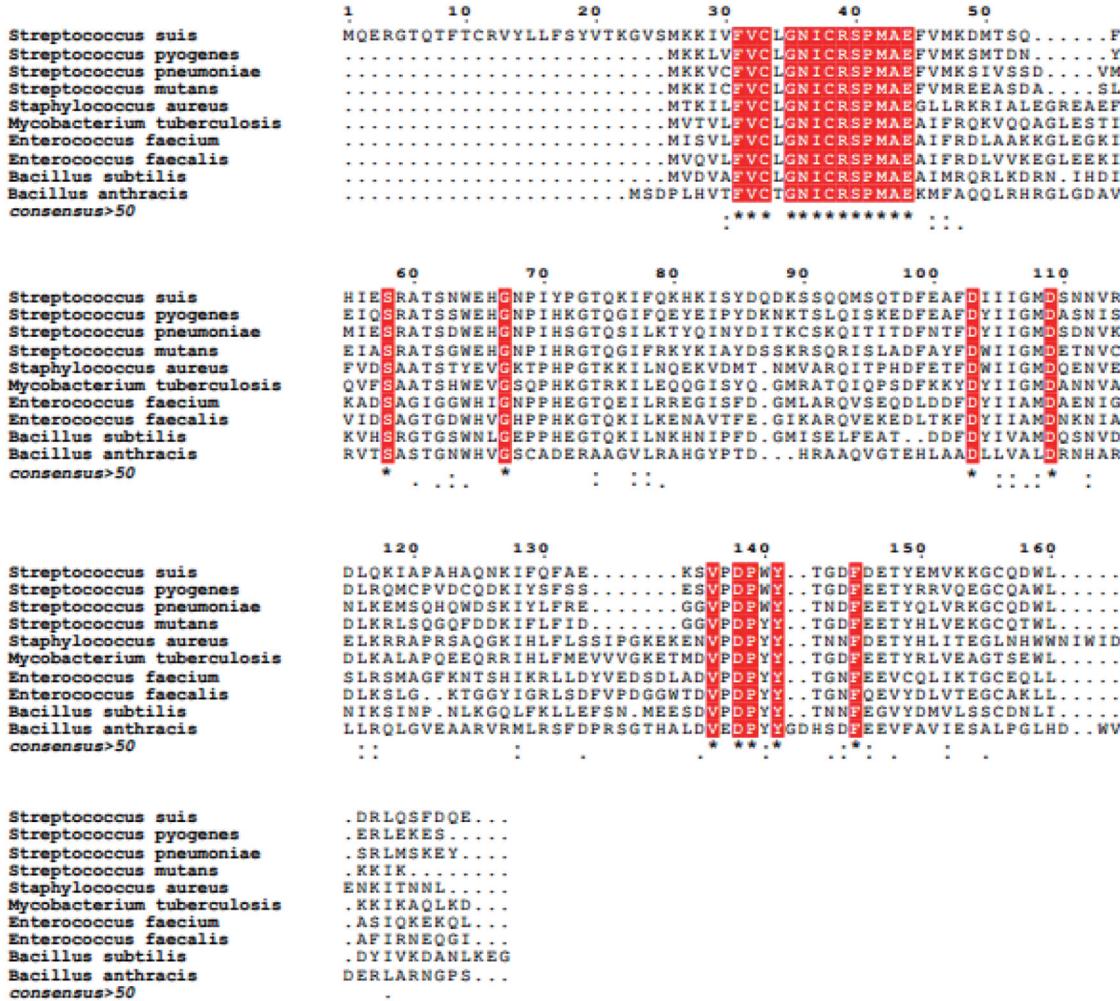


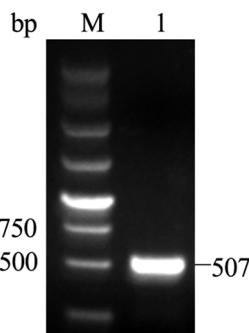
图 1 LMW-PTP 同源序列比对

Fig.1 Alignment asslysis of LMW-PTP homologous protein

2.2 LMW-PTP 基因的 PCR 扩增 LMW-PTP 基因 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 在 500~750 bp 之间有一清晰的 DNA 带, 与 LMW-PTP 基因的大小(507 bp)相符(图 2)。

2.3 重组质粒的构建 通过定点突变技术将 pET28a:LMW-PTP 重组蛋白的第 33 位半胱氨酸和第 39 位精氨酸分别突变为丙氨酸, 以野生型重组

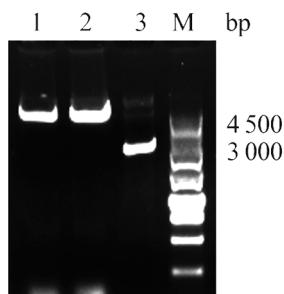
质粒 pET28a:LMW-PTP 为模板, 带有突变位点的引物 PCR 扩增得到突变型缺口重组质粒 pET28a:LMW-PTPC33A, pET28a: LMW-PTPR39A, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测如图(图 3)。野生型及突变型质粒经限制性内切酶 Nde I 和 Xho I 双酶切, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 酶切片段分别为载体片段 5 369 bp 和目的基因 507 bp(图 4)。



M:DNA 标志物;1:LMW-PTP 基因 PCR 产物

图 2 LMW-PTP 基因 PCR 产物电泳鉴定

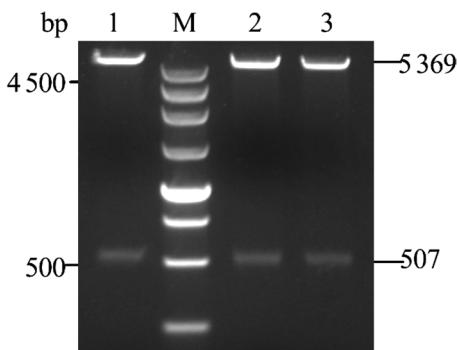
Fig.2 Product of PCR electrophoresis



1:pET28a;LMW-PTPC33A 缺口重组质粒;2:pET28a;LMW-PTPR39A 缺口质粒;3:pET28a;LMW-PTP 重组质粒;M:DNA marker

图 3 PCR 扩增突变质粒

Fig.3 Mutant recombinant plasmids of PCR electrophoresis



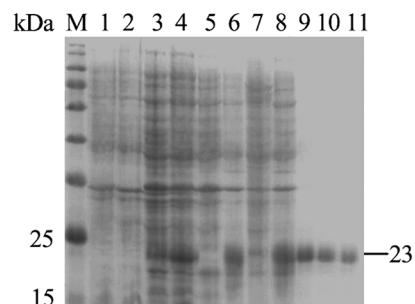
1:Nde I 和 Xho I 双酶切 pET28a;LMW-PTP;M:DNA 标志物;2:Nde I 和 Xho I 双酶切 pET28a;LMW-PTPC33A;3:Nde I 和 Xho I 双酶切 pET28a;LMW-PTPR39A

图 4 野生型和突变型重组质粒双酶切电泳鉴定

Fig.4 Restriction of wild type and mutat recombinant plasmids

2.4 重组质粒的诱导表达及鉴定 将野生蛋白 LMW-PTP 和突变重组蛋白 LMW-PTPC33A、LMW-PTPR39A 未诱导和诱导的菌液沉淀进行 SDS-PAGE, 表达蛋白大小均为 23 kDa, 与预期大小一致, 且空载 pET28a/BL21 不表达此蛋白。经诱导培养的重组菌经冰浴超声破碎, 分离上清和沉

淀, 野生型和突变型重组蛋白表达形式均为包涵体, 重组蛋白包涵体经 8 mol/L 脲溶解后用镍柱亲和层析纯化, 经梯度透析复性得到纯度较高的目的蛋白, SDS-PAGE 电泳分析如图 5。

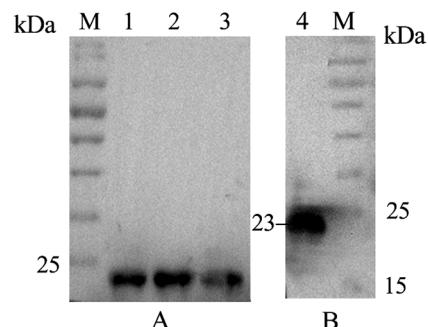


M:蛋白分子质量标准;1:pET28a/BL21 未诱导;2:pET28a/BL21 IPTG 诱导;3:pET28a;LMW-PTP/BL21 未诱导;4:pET28a;LMW-PTP/BL21 诱导;5:pET28a;LMW-PTPC33A/BL21 未诱导;6:pET28a;LMW-PTPC33A/BL21 IPTG 诱导;7:pET28a;LMW-PTPR39A/BL21 未诱导;8:pET28a;LMW-PTPR39A/BL21 IPTG 诱导;9:纯化的 LMW-PTP 蛋白;10:纯化的 LMW-PTPC33A 蛋白;11:纯化的 LMW-PTPR39A 蛋白

图 5 野生型和突变型 LMW-PTP 的诱导和纯化

Fig.5 SDS-PAGE profile of induced wild type and mutant LMW-PTP

2.5 LMW-PTP 重组蛋白兔多抗血清效价检测及鉴定 间接 ELISA 检测兔多抗血清效价为 1:102 400。Western blot 结果显示, 目的蛋白能分别被 His-Tag 单克隆抗体和兔多抗血清特异性识别, 说明 LMW-PTP 蛋白具有免疫原性(图 6)。



M:蛋白分子质量标准;1:His-Tag 单抗与 LMW-PTP 反应条带;2:His-Tag 单抗与 LMW-PTPC33A 反应条带;3:His-Tag 单抗与 LMW-PTPR39A 反应条带;4:兔多抗血清与 LMW-PTP 反应条带

图 6 Western blot 分析

Fig.6 Western blot of expressed recombination protein

2.6 LMW-PTP 酶学性质测定 根据标准曲线计算 LMW-PTP 的酶活为 2.1 nmol/(min · μg)。LMW-PTP 与不同浓度的 PNPP 反应测得磷酸酶动力学反应曲线如图 7, 求得 LMW-PTP Km 值为

6.6 mmol/L。

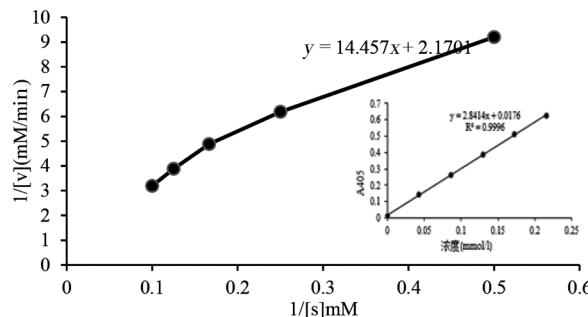


图 7 LMW-PTP 酶促反应动力学曲线

Fig.7 Lineweaver Burk plot showed the kinetic analysis of the LMW-PTP

2.7 野生型和突变型蛋白酶活比较 测定 LMW-PTPC33A 及 LMW-PTPR39A 活性如图 8,发现与 LMW-PTP 酶活相比,活力明显下降,说明 Cys³³ 和 Arg³⁹ 是 LMW-PTP 的活性位点。

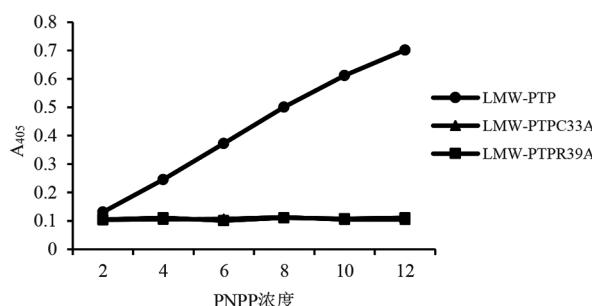


图 8 野生型和突变型 LMW-PTP 酶活

Fig.8 Phosphatase activity of the catalytically-active recombinant LMW-PTP and -inactive recombinant LMW-PTPC33A and LMW-PTPR39A

3 讨论

本文研究证实 2 型猪链球菌存在低分子量酪氨酸磷酸酶 LMW-PTP,其结构和特性与其它细菌中存在的 LMW-PTP 相似。在以前的研究中发现的 LMW-PTP 大多存在于革兰氏阴性菌中^[19],但本次研究证实了此类酪氨酸磷酸酶同样存在于革兰氏阳性菌中,同样在化脓链球菌^[20],金黄色葡萄球菌^[21]中也得到了证实。我们通过原核表达获得了大小为 23 kDa 的 2 型猪链球菌 LMW-PTP,与其他原核和真核生物中的 LMW-PTP 大小相似,均在 20 kDa 左右。其表达形式主要为包涵体,可能是因为蛋白的高疏水性导致蛋白在表达过程中形成了包涵体,通过改变 IPTG 浓度、转速、温度,虽然上清有少量目的蛋白表达,但是无法达到制备多克隆抗体所需

要的蛋白量。通过对纯化后的蛋白透析复性,我们仍可以获得大量有酪氨酸磷酸酶活性的蛋白。

部分细菌可分泌 LMW-PTP 可作用于宿主细胞,单独参与信号转导,如结核分枝杆菌通过分泌 ptpA 去磷酸化宿主蛋白 GSK3 α ,调控 GSK3 α 的抗凋亡活性进而抑制巨噬细胞的凋亡^[22-23],化脓链球菌分泌一种双特异性低分子量酪氨酸磷酸酶 SP-PTP,SP-PTP 不仅可以对磷酸化的酪氨酸残基去磷酸化,而且还对磷酸化的丝苏氨酸残基有作用,参与二元信号的转导^[18]。通过制备具有良好免疫反应性的 2 型猪链球菌 LMW-PTP 的兔多抗血清,为后续 2 型猪链球菌 LMW-PTP 的蛋白定位奠定基础。

根据枯草芽孢杆菌 LMW-PTP, YFKJ^[24] 和化脓链球菌 SP-PTP^[20] 的晶体结构,位于 N 末端 P-loop 上的半胱氨酸残基和精氨酸残基是发挥催化作用重要的残基。为了证实 2 型猪链球菌 LMW-PTP 的 N 末端 C³³ LGNICR³⁹ S 基序是否具有催化功能,我们利用定点突变技术将第 33 位的半胱氨酸和第 39 位的精氨酸分别突变为丙氨酸。比较野生型和突变蛋白水解底物 PNPP 的能力,发现突变蛋白水解 PNPP 的能力下降,证实了 2 型猪链球菌 LMW-PTP 的磷酸酶活性依赖于第 33 位半胱氨酸残基和第 39 位精氨酸残基。

蛋白磷酸化在细菌生命活动中发挥着至关重要的作用,如细胞生长,增殖,代谢以及毒力调节。前期我们已经发现 2 型猪链球菌存在丝苏氨酸磷酸化,并鉴定出丝苏氨酸激酶 stk 的多个底物,但是对 2 型猪链球菌酪氨酸磷酸化仍不清楚。通过对 2 型猪链球菌 LMW-PTP 的酪氨酸磷酸酶特性进行分析,为后续 2 型猪链球菌 LMW-PTP 的底物鉴定以及评估 LMW-PTP 在 2 型猪链球菌生理和致病机制中发挥的作用奠定了基础。

参考文献:

- [1] Yu H, Jing H, Chen Z, et al. Streptococcus suis study groups. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China [J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(6):914-920. DOI: 10.3201/eid1206.051194
- [2] Ye C, Zhu X, Jing H, et al. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China [J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(8):1203-1208.
- [3] Tang J, Wang C, Feng Y, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. PLoS Med, 2006, 3(5):668-676. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030151
- [4] Ye C, Bai X, Zhang J, et al. Spread of *Streptococcus suis* sequence type 7, China [J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(5):787. DOI: 10.3201/eid1405.070437

- [5] Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, et al. *Streptococcus suis*: past and present [J]. *Vet Res Communicat*, 1997, 21(6):381-407. DOI: 10.1023/A:1005870317757
- [6] Gottschalk M, Segura M, Xu J. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America [J]. *Anim Health Res Rev*, 2007, 8(1):29-45. DOI: 10.1017/S1466252307001247
- [7] Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, et al. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis* [J]. *Future Microbiol*, 2012, 7(2): 259-279. DOI: 10.2217/fmb.11.149
- [8] Caselli A, Paoli P, Santi A, et al. Low molecular weight protein tyrosine phosphatase: multifaceted functions of an evolutionarily conserved enzyme [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2016, 1864(10):1339-1355. DOI: 10.1016/j.bbapap.2016.07.001
- [9] Dadssi M, Cozzzone AJ. Evidence of protein-tyrosine kinase activity in the bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* [J]. *J Biological Chem*, 1990, 265(34):20996.
- [10] Potts M, Sun H, Mockaitis K, et al. A protein-tyrosine/serine phosphatase encoded by the genome of the *cyanobacterium Nostoc* commune UTEX 584 [J]. *J Biological Chem*, 1993, 268(11):7632-7635.
- [11] Cirri P, Chiarugi P, Camici G, et al. The role of Cysl2, Cysl7 and Arg18 in the catalytic mechanism of low-M(r) cytosolic phosphotyrosine protein phosphatase [J]. *Eur J Biochem*, 1993, 214 (3): 647-657. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17965.x
- [12] Zhang ZY, Wang Y, Wu L, et al. The Cys(X)5Arg catalytic motif in phosphoester hydrolysis [J]. *Biochemistry*, 1994, 33 (5): 15266-15270.
- [13] Bliska JB. Yop effectors of *Yersinia* spp. and actin rearrangements [J]. *Trends Microbiol*, 2000, 8(5):205-208. DOI: 10.1016/S0966-842X(00)01738-8
- [14] Wugeditz T, Paiment A, Hocking J, et al. Phosphorylation of Wzc, a tyrosine autokinase, is essential for assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli* [J]. *J Biological Chem*, 2001, 276 (4):2361-2371. DOI: 10.1074/jbc.M009092200
- [15] Castanet J, Prost J, Peyron P, et al. Tyrosine phosphatase MptpA of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits phagocytosis and increases actin polymerization in macrophages [J]. *Res Microbiol*, 2005, 156 (10): 1005-1013. DOI: 10.1016/j.resmic.2005.05.013
- [16] Singh R, Rao V, Shakila H, et al. Disruption of mptpB impairs the ability of *Mycobacterium tuberculosis* to survive in guinea pigs [J]. *Mol Microbiol*, 2003, 50(3):751-762. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03712.x
- [17] Chen C, Tang J, Dong W, et al. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of, *S. suis*, 2 Chinese isolates [J]. *PLoS One*, 2007, 2(3): e315. DOI: 10.1371/journal.pone.0000315
- [18] Kan S, Agarwal S, Pancholi P. The *Streptococcus pyogenes* orphan protein tyrosine phosphatase, SP-PTP, possesses dual specificity and essential virulence regulatory functions [J]. *Mol Microbiol*, 2015, 97(3):515-540. DOI: 10.1111/mmi.13047
- [19] Shi L, Potts M, Kennelly PJ. The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait [J]. *FEMS Microbiol*, 1998, 22(4):229-253. DOI: 10.1016/S0168-6445(98)00015-1
- [20] Ku B, Keum CW, Lee HS, et al. Crystal structure of SP-PTP, a low molecular weight protein tyrosine phosphatase from *Streptococcus pyogenes* [J]. *Biochemical Biophysical Res Communicat*, 2016, 478(3):1217-1222. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.08.097
- [21] Brelle S, Baronian G, Huchbrandt S, et al. Phosphorylation-mediated regulation of the *Staphylococcus aureus* secreted tyrosine phosphatase PtpA [J]. *Biochemical Biophysical Res Communicat*, 2016, 469(3):619. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.11.123
- [22] Bach H, Papavinasasundaram KG, Wong D, et al. *Mycobacterium tuberculosis* virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B [J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 3(5):316-322. DOI: 10.1016/j.chom.2008.03.008
- [23] Poirier V, Bach H, Avgay Y. *Mycobacterium tuberculosis* promotes anti-apoptotic activity of the macrophage by PtpA protein-dependent dephosphorylation of host GSK3 α [J]. *J Biological Chem*, 2014, 289 (42): 29376-29385. DOI: 10.1074/jbc.M114.582502
- [24] Musumei L, Bongiorni C, Tautz L, et al. Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatases of *Bacillus subtilis* [J]. *Society*, 2005, 187(14): 4945-4956. DOI: 10.1128/jb.187.14.4945-4956.2005