



肠炎沙门菌肽脯氨酰顺反异构酶SlyD的基因敲除、表达及酶学特征

郭荣显, 朱姗姗, 焦扬, 安树敏, 薛颖, 费晓, 耿士忠, 潘志明, 焦新安*

扬州大学, 江苏省人兽共患病学重点实验室/江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏扬州 225009

摘要: 【目的】以肠炎沙门菌肽脯氨酰顺反异构酶SlyD为对象, 构建基因缺失株及表达纯化该蛋白, 为研究其在肠炎沙门菌致病性与应激等方面的作用奠定基础。【方法】参考GenBank登录的肠炎沙门菌基因组序列设计用于slyD基因敲除及原核表达的特异引物, 运用自杀质粒介导的同源重组技术对肠炎沙门菌C50041 slyD基因进行敲除, 构建C50041ΔslyD缺失株; 原核表达SlyD蛋白, 通过α-糜蛋白酶耦联法对其PPIase活性进行测定; 利用生物信息学相关软件, 分析SlyD蛋白的氨基酸序列及功能域。【结果】PCR鉴定与测序结果证明成功构建了肠炎沙门菌C50041ΔslyD缺失株, 其生长特性与野生株基本一致; SDS-PAGE及PPIase活性分析表明, 获得了具有生物活性的可溶性SlyD蛋白; 生物信息学分析显示SlyD蛋白由FKBP样肽脯氨酰顺反异构酶结构域、分子伴侣功能域和金属结合区域3个功能区域组成。【结论】成功获得了肠炎沙门菌C50041ΔslyD缺失株和具有PPIase活性的重组SlyD蛋白。

关键词: 肠炎沙门菌, SlyD蛋白, 基因敲除, 肽脯氨酰顺反异构酶

肠炎沙门菌(*Salmonella enterica* serovar enteritidis)是一种重要的人兽共患病原菌, 在范围内广泛流行。食用被污染的禽肉制品及蛋制品是人类感染肠炎沙门菌的主要来源, 一般导致胃肠道局部疾病, 引发呕吐和腹泻等症状^[1]。肠炎沙门菌的致病机理及防控措施愈来愈受到人们关注, 与细菌致病性、应激及对外界环境感应相

关的调控机制也已成为新的研究热点。

一般而言, 生物体内新生肽链成熟为功能蛋白需要折叠酶和分子伴侣的辅助才能完成。肽脯氨酰顺反异构酶(Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIase)和二硫键异构酶(Protein disulfide isomerase, PDI)催化蛋白质折叠过程的限速步骤, 是目前已被确定的两类折叠酶^[2]。SlyD (sensitive to lysis

基金项目: 国家自然科学基金重点国际合作项目(31320103907); 国家公益性行业(农业)科研专项(201403054); 江苏省优势学科经费资助; 江苏省研究生培养创新工程项目(KYLX15_1384)

*通信作者。Tel: +86-514-87971803; Fax: +86-514-87311374; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

收稿日期: 2015-11-03; 修回日期: 2016-01-10; 网络出版日期: 2016-01-22

protein D)最初发现其作为宿主因子参与噬菌体Phi X174的溶菌过程而被命名,是肽脯氨酰顺反异构酶家族的FK506结合蛋白(FK506-binding protein, FKBP)样PPIase,存在于胞质内,催化Xaa-Pro(Xaa代表任意一种氨基酸)之间肽键的顺反异构化,同时具有分子伴侣活性,作为折叠助手促进易聚合蛋白的再折叠和可溶性^[3-4]。SlyD在镍铁氢化酶([Ni-Fe]-hydrogenase)成熟过程中扮演着多重角色,其位于羧基端的金属结合位点发挥储Ni的作用,能促进蛋白构象改变,同时通过分子伴侣功能域与HypB结合,由HypB将Ni转运给镍铁氢化酶^[5]。幽门螺杆菌2个最重要的含金属酶(镍铁氢化酶、脲酶urease)的金属催化活性中心都需要镍的组装,SlyD金属伴侣的功能在保持金属离子平衡的生命活动中发挥了至关重要的作用^[6]。值得注意的是,FKBP蛋白家族广泛存在于各生物体中,参与细菌在巨噬细胞内的持续定殖,抵御宿主细胞杀伤等,在哺乳动物细胞中更是发挥着诸如蛋白折叠、信号转导和细胞凋亡等重要作用^[7-8]。关于SlyD在肠炎沙门菌中的功能研究至今鲜有报道。

沙门菌毒力岛(*Salmonella* pathogenicity island, SPI)编码的III型分泌系统(Type III secretion system, TTSS)与沙门菌致病性密切相关^[9]。储存在胞质内的效应蛋白需要分子伴侣的参与以调控分泌,沙门菌TTSS基底结构的PrgJ证明是一个部分折叠蛋白^[10-11]。双精氨酸转运(Twin-arginine translocation, Tat)则是另一个蛋白分泌跨膜转运系统,该系统在细菌毒力方面同样发挥重要作用,但与Sec分泌途径相比,Tat只转运已正确折叠的蛋白^[12]。Tat系统优先选择折叠正确的蛋白依赖于伴侣蛋白的参与,通用型的伴侣蛋白SlyD能够结合不同的Tat信号肽,借助于折叠系统对那些没有特异性伴侣蛋白的Tat底物的校对发挥着重要作用^[13]。此外,细菌在对环境压力改变或营养胁迫等做出的一系列应激反应过程中转录因子调控的应激蛋白

主要包括一些分子伴侣、蛋白降解酶及折叠蛋白等^[14]。综上所述,SlyD蛋白参与调控细菌毒力、应激及分子伴侣的特性,可能在肠炎沙门菌致病性和对抗不利环境发挥重要作用。

本研究以SlyD蛋白为对象,探索其在肠炎沙门菌中的相关功能。实验应用自杀质粒介导的基因同源重组技术,无痕敲除了肠炎沙门菌*slyD*基因,构建了C50041 Δ *slyD*缺失株,并原核表达了SlyD重组蛋白,为研究肠炎沙门菌SlyD在致病性和应激调控等方面发挥的功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

肠炎沙门菌C50041、大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 、*E. coli* Spy372 (λ pir)、*E. coli* χ 7213 ($Km^R\Delta$ asd)、*E. coli* BL21 (DE3),自杀质粒pGMB152 ($Amp^R Sm^R$)、原核表达质粒pET28 (a)、氯霉素抗性质粒pMD- Cm^R 均由本实验室保存。克隆载体pMD20-T购自宝生物(大连)有限公司。

1.2 主要试剂

限制性内切酶, *Taq* DNA聚合酶, dNTPs, DNA Marker, 低分子量的蛋白质Marker, 质粒小量提取试剂盒, 细菌基因组DNA提取试剂盒, 琼脂糖凝胶回收试剂盒均购自TaKaRa公司; T4连接酶购自NEB公司; α -糜蛋白酶购自Sigma公司; 蛋白纯化试剂盒购自Novagen公司; 其余常规试剂均为国产或进口分析纯产品。

1.3 引物的设计与合成

根据GenBank登录的肠炎沙门菌基因组序列,利用引物设计软件Primer 5.0设计特异性引物(表1),由南京金斯瑞生物有限公司合成。

1.4 肠炎沙门菌C50041 Δ *slyD*缺失株的构建

以肠炎沙门菌C50041基因组DNA为模板,PCR扩增*slyD*上、下游同源臂*slyD*12、*slyD*34片段,然后以回收纯化的*slyD*12、*slyD*34 PCR产物

表1. PCR扩增的引物序列
Table 1. Primers used for PCR in this study

Primer	Primer sequences (5'→3')	Amplicon size/bp	Notes
<i>slyD</i> 12-F	AAGTCGACCTCGAGTGAACCGGAAGACACGATGAA	665	<i>Sal</i> I, <i>Xho</i> I
<i>slyD</i> 12-R	TTGAAAATTCCTCCCGGAGCATTGGCGCAGATTGTAGCGG	complementary sequence	
<i>slyD</i> 34-F	CCGCTACAATCTGCGCCAATGCTCCCGGGGAATTTCAA		complementary sequence
<i>slyD</i> 34-R	AAGTCGACGCCGCTTTTTGATCGTCGT	706	<i>Sal</i> I
<i>slyD</i> YZ-F	GAGGTGAACAATGGCAATCCGTAA		1205 (WT)
<i>slyD</i> YZ-R	ACATGAAATGGAGATGGCGAAGC	521 (Δ <i>slyD</i>)	
<i>slyD</i> -F	CGGAATTCATGAAAGTAGCAAAAAGACCTGG	609	<i>Eco</i> R I
<i>slyD</i> -R	CGCTCGAGCTTGAAGACGACAGGGATTA		<i>Xho</i> I

为模板进行SOEing PCR^[15], 扩增 Δ *slyD*片段。*Xho* I酶切回收 Δ *slyD*与 Cm^R 片段, 拼接后连接到自杀质粒pGMB152, 接合转移至受体菌肠炎沙门菌C50041中, 通过自杀质粒介导的同源重组^[16], 实现*slyD*基因的缺失。

1.5 缺失株生长特性的测定

将肠炎沙门菌C50041 Δ *slyD*缺失株与野生株C50041过夜培养物转接于LB液体培养基中, 调整初始浓度为 10^6 CFU/mL, 37 °C、180 r/min培养, 每隔1 h进行取样、倍比稀释、涂板计数, 根据计算的菌落数比较2株细菌的生长速率。

1.6 肠炎沙门菌SlyD的原核表达

肠炎沙门菌C50041基因组DNA作为模板扩增*slyD*基因, 克隆至pMD20-T, 通过氨苄青霉素和蓝白斑筛选获得阳性克隆质粒pMD-*slyD*。以*Eco*R I、*Xho* I双酶切pMD-*slyD*和pET28 (a), 用T4 DNA连接酶进行连接, 将鉴定出的pET-*slyD*重组质粒转化*E. coli* BL21 (DE3), 获得重组原核表达菌*E. coli* DE3 (pET-*slyD*)。将重组菌接种于含卡那霉素的LB液体培养基中, 37 °C振荡过夜培养后, 按1:100比例接种于新鲜培养基中, 37 °C振荡培养2 h, 加入终浓度1 mmol/L IPTG诱导培养, 分别在不同的诱导时间下, 取诱导菌液离心, 超声波裂

解, 进行SDS-PAGE分析。*SlyD*蛋白纯化用Ni-NTAHis-Bind Purification Kit进行。

1.7 PPIase活性测定

通过 α -糜蛋白酶耦联法进行PPIase活性的测定^[17]。取20 μ L *SlyD*蛋白溶液(约1 μ g, 溶解于200 mmol/L Tris-HCl)加到460 μ L预冷的检测缓冲液(200 mmol/L Tris-HCl, 20 nmol/L α -糜蛋白酶, pH 8.0), 充分混匀后置于4 °C孵育5 min。然后加入20 μ L预冷的5 mmol/L suc-AAFP-pNA (溶解于含450 mmol/L LiCl的三氟乙醇溶液), 迅速混匀以引发反应, 通过分光光度计连续监测 A_{405} 。

1.8 肠炎沙门菌SlyD蛋白的结构分析

应用BLAST, SMART, TMHMM, SignalP, PHD和SWISS MODEL等蛋白质在线分析软件, 结合相关文献报道^[18], 对肠炎沙门菌*SlyD*进行序列及结构分析。

2 结果和分析

2.1 肠炎沙门菌C50041 Δ *slyD*缺失株的鉴定

2.1.1 重组自杀性质粒pGMB- Δ *slyD*/ Cm^R 的构建与鉴定: 以肠炎沙门菌C50041基因组DNA为模板, 分别以*slyD*12-F/R和*slyD*34-F/R两对引物扩增*slyD*上、下游同源臂*slyD*12、*slyD*34片段, 大小分

别为665 bp和706 bp, 通过SOEing PCR拼接上下游同源序列获得 $\Delta slyD$ 片段(图1-A), 克隆入pMD20-T, 构建重组质粒pMD- $\Delta slyD$, 酶切和测序鉴定正确(图1-B)。将 Cm^R 基因通过酶切, 插入

到pMD- $\Delta slyD$ 质粒 Xho I限制性内切酶位点, 随后通过 Sal I将 $\Delta slyD/Cm^R$ 整体切下, 克隆入pGMB152质粒, 构建重组自杀质粒pGMB- $\Delta slyD/Cm^R$, 酶切鉴定拼接正确(图1-C)。

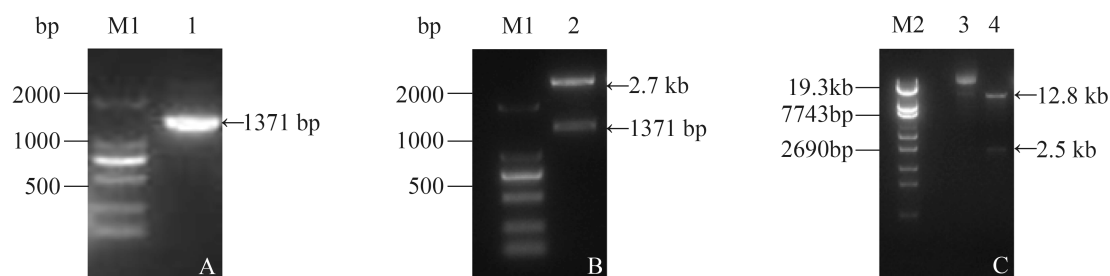


图 1. 重组自杀性质粒pGMB- $\Delta slyD/Cm^R$ 的构建与鉴定

Figure 1. Construction and identification of plasmid pGMB- $\Delta slyD/Cm^R$. M1: DNA marker DL2000; M2: DNA marker λ -EcoT14; lane 1: $\Delta slyD$ spliced by SOEing PCR; lane 2: pMD- $\Delta slyD$ plasmid digested by Sal I; lane 3: pGMB- $\Delta slyD/Cm^R$; lane 4: pGMB- $\Delta slyD/Cm^R$ digested with Sal I and Xho I.

2.1.2 肠炎沙门菌C50041 $\Delta slyD$ 缺失株的筛选: 通过接合转移获得的阳性接合子在含100 g/L蔗糖的无NaCl液体LB培养基中连续传代5次后, 稀释涂布LB固体培养板, 利用验证引物筛选C50041 $\Delta slyD$ 缺失株。与野生株相比, 缺失株仅能扩增出大小约500 bp的片段(图2)。利用交叉引物 $slyD12$ -F和 $slyD34$ -R扩增测序, 证实C50041 $\Delta slyD$ 缺失株成功构建。

2.2 缺失株的生长特性

肠炎沙门菌C50041 $\Delta slyD$ 缺失株与野生株的

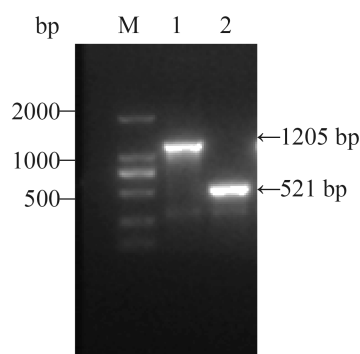


图 2. 肠炎沙门菌C50041 $\Delta slyD$ 缺失株的PCR鉴定

Figure 2. PCR identification of C50041 $\Delta slyD$ with $slyDYZ$ -F/R. M: DNA marker DL2000; lane 1: C50041 wild type; lane 2: C50041 $\Delta slyD$.

生长特性基本一致, $slyD$ 基因的敲除不影响肠炎沙门菌的生长速率。

2.3 肠炎沙门菌SlyD的原核表达

2.3.1 $slyD$ 基因的克隆与原核表达质粒的构建: 以肠炎沙门菌基因组DNA为模板, PCR扩增得到大小609 bp的 $slyD$ 基因序列(图3-A), 克隆入pMD20-T载体获得重组质粒pMD- $slyD$, 酶切及测序正确(图3-B)。质粒pET28 (a)与重组质粒PMD- $slyD$ 均用 Eco R I、 Xho I进行酶切, 酶切后的pET28 (a)和目的基因 $slyD$ 经T4 DNA连接酶连接, 最终转化表达菌 $E. coli$ BL21(DE3)感受态细胞, 重组表达质粒经酶切鉴定证实 $slyD$ 已成功克隆至原核表达载体pET28 (a)(图3-C)。

2.3.2 重组蛋白的诱导表达: 重组菌 $E. coli$ BL21 (DE3) (pET- $slyD$) 37 °C培养2 h, 加入IPTG诱导蛋白表达, 通过SDS-PAGE分析, 重组SlyD蛋白大小约28 kDa, 主要存在裂解上清中(图4), 表明重组蛋白为可溶性表达, 在诱导后第2、4、6小时均有大量上清表达(图5)。最佳诱导条件确定为37 °C、180 r/min条件下, 加入终浓度1 mmol/L IPTG诱导6 h。

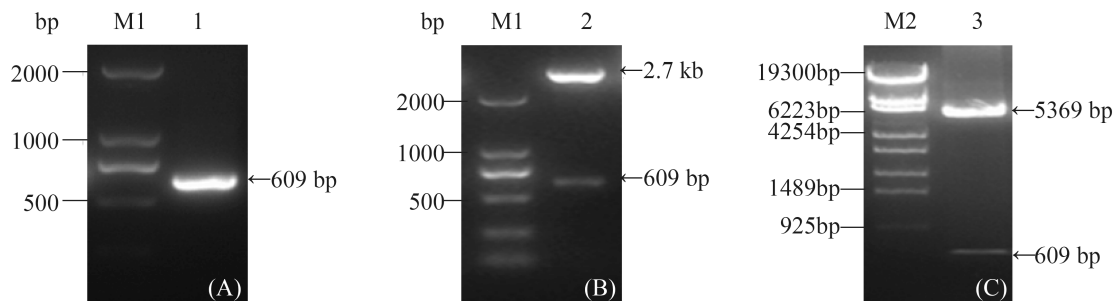


图 3. 原核表达质粒pET-*slyD*的构建及鉴定

Figure 3. Construction and identification of recombinant expression plasmid pET-*slyD*. M1: DNA marker DL2000; M2: DNA marker λ -EcoT14; lane 1: PCR amplification of *slyD* gene; lane 2: pMD-*slyD* plasmid digested by *EcoR* I and *Xho* I; lane 3: pET-*slyD* digested with *EcoR* I and *Xho* I.

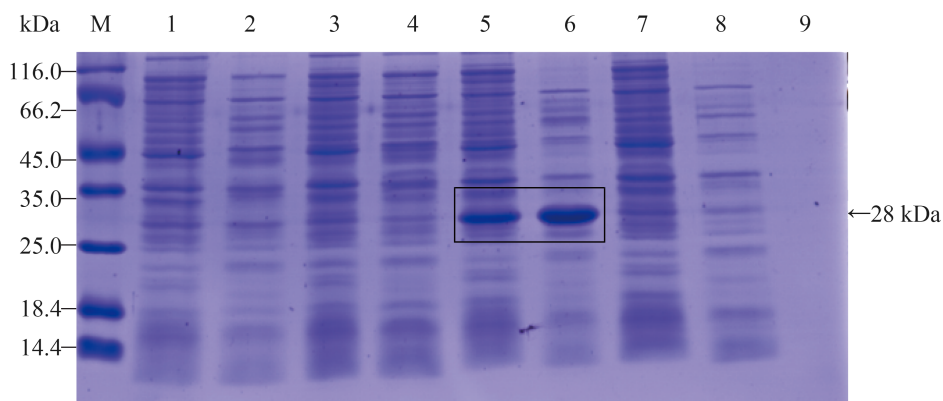


图 4. 重组菌表达产物的SDS-PAGE分析

Figure 4. SDS-PAGE analysis of SlyD expression in *E. coli* BL21(DE3). M: low molecular weight protein marker; lane 1: precipitation of pET-*slyD* before induction; lane 2: supernatant of pET-*slyD* before induction; lane 3: precipitation of pET28(a) before induction; lane 4: supernatant of pET28(a) before induction; lane 5: precipitation of pET-*slyD* after induction; lane 6: supernatant of pET-*slyD* after induction; lane 7: precipitation of pET28(a) after induction; lane 8: supernatant of pET28(a) after induction; lane 9: SW.

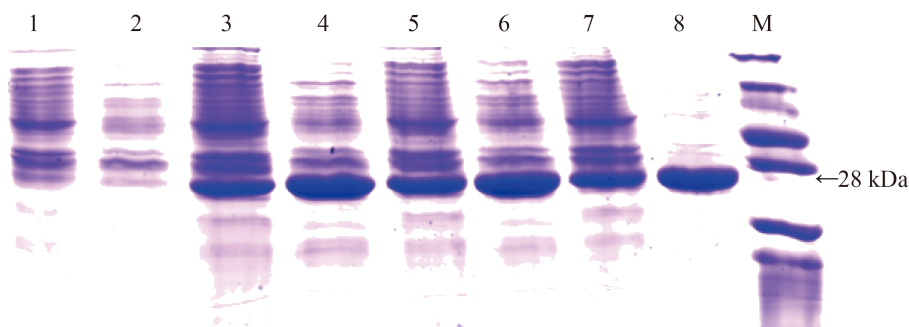


图 5. SlyD在不同诱导时间的表达量

Figure 5. SlyD protein induced at different times and detect with SDS-PAGE. lane 1, 3, 5, 7: precipitation of pET-*slyD* induced for 0, 2, 4, 6 hours, respectively; lane 2, 4, 6, 8: supernatant of pET-*slyD* induced for 0, 2, 4, 6 hours, respectively; M: low molecular weight protein marker.

2.4 SlyD的PPIase活性

α -糜蛋白酶能切割底物脯氨酰反式结构酰胺键的羧基端, 产生生色物质p-硝基苯胺, 对顺式构型不起作用, 由于PPIase能提高脯氨酰顺反异构的转换速率, 因此可以通过连续测定405 nm处的吸收值, 通过糜蛋白酶耦联的方法测定PPIase的催化活性。催化反应显示, 肠炎沙门菌SlyD蛋白具有生物活性(图6)。

2.5 SlyD蛋白结构域

通过软件预测并结合文献分析, 肠炎沙门菌SlyD蛋白主要由3个功能区域组成, FKBP样肽脯氨酰异构酶结构域、分子伴侣功能域和金属结合区域(图7)。位于邻近肽脯氨酰异构酶活性中心的茎环结构中有一个分子伴侣结构域, 该茎环结构在FKBP12蛋白中被称作襟翼结构, 分子伴侣结构域因此也被称为IF (Insert-in-flap)结构域。金属

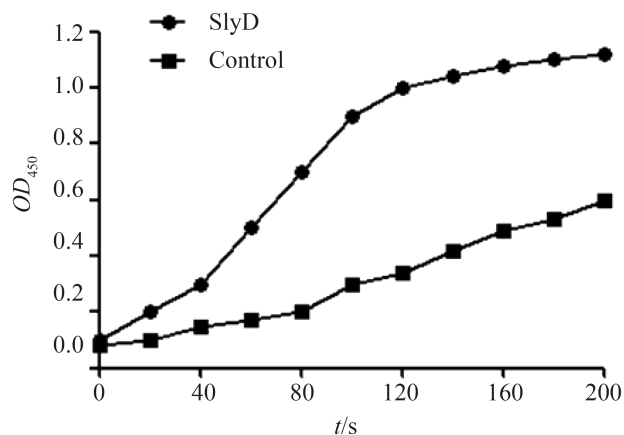


图 6. 肠炎沙门菌SlyD蛋白具有PPIase催化活性

Figure 6. Catalytic activity confirmed that the *Salmonella* C50041 SlyD protein was biologically active.

结合区位于羧基端, 该段富含甘氨酸、组氨酸、谷氨酸和半胱氨酸等具有潜在结合 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 及 Zn^{2+} 等金属离子的氨基酸残基。

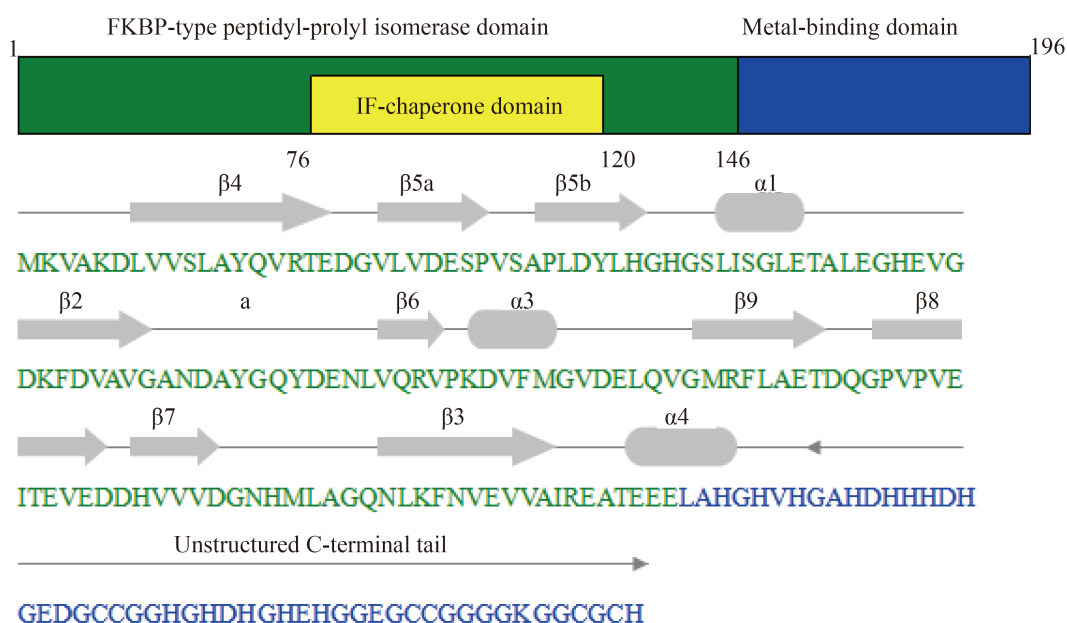


图 7. 肠炎沙门菌SlyD蛋白的结构与序列分析

Figure 7. SlyD domain architecture and amino acid sequence.

3 讨论

伴随着蛋白质折叠过程及机理研究的不断深

入, 大量具有典型催化脯氨酰顺反异构活性特征的蛋白家族被发现和鉴定。目前, PPIase包括FKBP样蛋白、亲环蛋白(Cyclophilin)和微小蛋白

(Parvulin) 3个不同的家族, 存在于间周质(SurA、FkpA、PpiD等)和胞质(SlyD)内。间周质PPIase由于具有分子伴侣及折叠催化作用而最先引起研究者的关注。其中, 沙门菌SurA、FkpA在毒力、外膜蛋白转运和饥饿应激反应中扮演着重要角色^[19]。SlyD是已知存在于细胞质内的PPIase, 其是否参与维持胞质内分泌蛋白的稳定和调控肠炎沙门菌毒力是我们对该蛋白产生兴趣的原因所在。

肠炎沙门菌SlyD蛋白的生物信息学分析为研究其功能提供了必要的基础。序列比对分析表明, 肠炎沙门菌SlyD蛋白与大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、弗氏柠檬酸杆菌等高度同源(同源性 > 97%)。SlyD蛋白主要由FKBP样肽脯氨酰顺反异构酶结构域、分子伴侣功能域和金属结合区域3个功能区域组成。SlyD具有一个独立于异构酶活性部位之外的多肽结合部位, 正是通过该多肽结合部位, 使其能高效地促进那些以肽脯氨酰顺反异构化为限速步骤的蛋白质的折叠, 因此SlyD能同时具有异构酶活力和分子伴侣活性, 更加有效的行使其折叠酶功能。本研究表达纯化的SlyD蛋白表现出的PPIase活性, 即证明了软件分析的这一结果, 而且与该类蛋白文献报道的酶活特性基本一致^[20]。

幽门螺杆菌SlyD蛋白能通过活化ERK (Extracellular signal-regulated kinase, ERK)介导的促有丝分裂信号通路干扰细胞凋亡, 促进胃上皮细胞的增殖, 表明SlyD蛋白与细菌致病性直接相关^[21]。SlyD作为一个公认的胞质蛋白如何能在胞外发挥功能? 笔者认为SlyD蛋白可能与底物蛋白相结合, 通过三型分泌系统或者Tat系统转运到细菌胞外, 进而与宿主细胞产生相互作用。肠炎沙门菌SlyD蛋白的亚细胞定位、与肠上皮细胞及巨噬细胞的互作值得我们深入研究。

细菌应激状态下, 蛋白质翻译错误的几率明显升高, 针对环境压力的改变, 细菌会启动全局

调控机制, 产生分子伴侣、ATP-依赖型蛋白酶、折叠辅助蛋白(肽脯氨酰顺反异构酶、巯基二硫键异构酶等)等系列反应以维持生命活动。tmRNA具备信使RNA和转录RNA的功能, 被认为是细菌体内蛋白质合成中起“质量控制”的物质基础之一。SsrA编码的tmRNA系统可识别SlyD蛋白^[22]。SlyD作为一个功能如此多样的蛋白, 是否与肠炎沙门菌应激调控相关, 同样值得我们进一步探索。

基于自杀质粒介导的同源重组技术构建缺失株的策略业已成为研究细菌基因功能的有效手段。本研究利用自杀质粒pGMB152构建肠炎沙门菌C50041 Δ slyD缺失株, 通过SOEing PCR完成上下游同源臂的拼接, 不仅避免了酶切连接的繁琐, 而且有利于基因无痕敲除的操作, 将 Cm^R 插入 Δ slyD片段的5'端促使抗性基因不随同源片段整合进入细菌基因组, 保证了缺失株的生物安全性。

本文构建的肠炎沙门菌C50041 Δ slyD缺失株, 表达纯化的具有生物活性的SlyD蛋白, 为开展SlyD的功能研究提供了必需的生物材料。

参考文献

- [1] Guard-Petter J. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(7): 421–30.
- [2] Schmidpeter PAM, Schmid FX. Prolyl isomerization and its catalysis in protein folding and protein function. *Journal of Molecular Biology*, 2015, 427(7): 1609–1631.
- [3] Scholz C, Eckert B, Hagn F, Schaarschmidt P, Balbach J, Schmid FX. SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities. *Biochemistry*, 2006, 45(1): 20–33.
- [4] Roof WD, Young R. ϕ X174 lysis requires *SlyD*, a host gene which is related to the FKBP family of peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases. *FEMS Microbiology Reviews*, 1995, 17(1/2): 213–218.
- [5] Kaluarachchi H, Altenstein M, Sugumar SR, Balbach J, Zamble DB, Haupt C. Nickel binding and [NiFe]-hydrogenase maturation by the metallochaperone SlyD with a single metal-binding site in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*,

- 2012, 417(1/2): 28–35.
- [6] Gong YH, Chen MY, Xu Y, Dong NN, Sang ZK, Liu J, Yuan Y. Subtractive hybridization analysis of gastric diseases-associated *Helicobacter pylori* identifies peptidyl-prolyl isomerase as a potential marker for gastric cancer. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 320(2): 103–109.
- [7] Norville IH, Harmer NJ, Harding SV, Fischer G, Keith KE, Brown KA, Sarkar-Tyson M, Titball RW. A *Burkholderia pseudomallei* macrophage infectivity potentiator-like protein has rapamycin-inhibitable peptidylprolyl isomerase activity and pleiotropic effects on virulence. *Infection and Immunity*, 2011, 79: 4299–4307.
- [8] Kang CB, Hong Y, Dhe-Paganon S, Yoon HS. FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions. *Neurosignals*, 2008, 16(4): 318–325.
- [9] Moest TP, Méresse S. *Salmonella* T3SSs: successful mission of the secret (ion) agents. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16(1): 38–44.
- [10] Parsot C, Hamiaux C, Page AL. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(1): 7–14.
- [11] Zhong DL, Lefebvre M, Kaur K, McDowell MA, Gdowski C, Jo S, Wang Y, Benedict SH, Lea SM, Galan JE, De Guzman RN. The *Salmonella* type III secretion system inner rod protein PrgJ is partially folded. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(30): 25303–25311.
- [12] De Buck E, Lammertyn E, Anné J. The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(9): 442–453.
- [13] Sturm A, Schierhorn A, Lindenstrauss U, Lilie H, Brüser T. YcdB from *Escherichia coli* reveals a novel class of Tat-dependently translocated hemoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(20): 13972–13978.
- [14] Guo MS, Gross CA. Stress-induced remodeling of the bacterial proteome. *Current Biology*, 2014, 24(10): R424–R434.
- [15] Yin YL, Zhu GQ, Geng SZ, Hu MZ, Jiao XA. Construction and characterization of a mutant strain of *Listeria monocytogenes* with a deletion of *actA* and *plcB*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(3): 299–303. (in Chinese)
- 殷月兰, 朱国强, 耿士忠, 胡茂志, 焦新安. 产单核细胞李斯特菌 *actA/plcB* 缺失株的构建及其生物学特性. *微生物学报*, 2008, 48(3): 299–303.
- [16] Geng SZ, Liu NN, Jiao XA, Liu H, Guo RX, Qian SS, Li YC, Pan ZM. Development and identification of *spiC* gene-deleted *Salmonella pullorum* mutant strain $\Delta spiC$. *Chinese Veterinary Science*, 2014, 44(4): 379–386. (in Chinese)
- 耿士忠, 刘男男, 焦新安, 刘欢, 郭荣显, 钱珊珊, 李昱辰, 潘志明. 鸡白痢沙氏门菌 S06004 $\Delta spiC$ 突变株的构建与鉴定. *中国兽医科学*, 2014, 44(4): 379–386.
- [17] Kang D, Gong YH, Zhu YM, Li AD, Dong NN, Piao Y, Yuan Y. The biological activity of *H. pylori* SlyD *in vitro*. *Helicobacter*, 2013, 18(5): 347–355.
- [18] Löw C, Neumann P, Tidow H, Weininger U, Haupt C, Friedrich-Epler B, Scholz C, Stubbs MT, Balbach J. Crystal structure determination and functional characterization of the metallochaperone SlyD from *Thermus thermophilus*. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 398(3): 375–390.
- [19] Behrens-Kneip S. The role of SurA factor in outer membrane protein transport and virulence. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010, 300(7): 421–428.
- [20] Kovermann M, Schmid FX, Balbach J. Molecular function of the prolyl *cis/trans* isomerase and metallochaperone SlyD. *Biological Chemistry*, 2013, 394(8): 965–975.
- [21] Zhu YM, Chen MY, Gong YH, Liu ZY, Li AD, Kang D, Han F, Liu JW, Liu J, Yuan Y. *Helicobacter pylori* FKBP-type PPIase promotes gastric epithelial cell proliferation and anchorage-independent growth through activation of ERK-mediated mitogenic signaling pathway. *FEMS Microbiology Letters*, 2015, 362(7), doi: 10.1093/femsle/fnv023. Epub 2015 Feb 16.
- [22] Roche ED, Sauer RT. Identification of endogenous SsrA-tagged proteins reveals tagging at positions corresponding to stop codons. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(30): 28509–28515.

Deletion-mutant construction, prokaryotic expression and characterization of peptidal-prolyl cis-trans isomerase SlyD from *Salmonella enteritidis*

Rongxian Guo, Shanshan Zhu, Yang Jiao, Shumin An, Ying Xue, Xiao Fei, Shizhong Geng, Zhiming Pan, Xinan Jiao*

Key Laboratory of Zoonoses of Jiangsu Province, Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses of Jiangsu Province, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* is an important food-borne pathogen of human and animal. To further study the function of SlyD associated with virulence and regulation in stress responses of *Salmonella enteritidis*, we constructed *slyD* gene-deletion mutant, expressed it in *E. coli*, and characterized the PPIase enzyme obtained. [Methods] The *slyD* gene-deletion mutant of *Salmonella enteritidis* C50041 was constructed by suicide plasmid mediated homologous recombination. *Salmonella enteritidis slyD* prokaryotic expression vector was carried out in *E. coli*, and PPIase activity of recombination SlyD was measured in protease-coupling assay with chymotrypsin. For amino acids conservation studies, functional domain searches and secondary structure predictions, the BLAST, SMART, TMHMM, SignalP, PHD and SWISS MODEL were used. [Results] *Salmonella enteritidis* C50041 $\Delta slyD$ mutant strain was successfully constructed. The growth rate of *slyD*-deleted strain was identified consistent with its parent strain C50041. A soluble recombinant SlyD protein was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells and confirmed by SDS-PAGE. Catalytic activity confirmed that the SlyD protein was biologically active. Bioinformatic analysis showed that *Salmonella enteritidis* SlyD as a multifaceted protein including three separated domains, the FKBP type peptidal-prolyl cis-trans isomerase domain, the IF chaperone domain and the metal-binding domain. [Conclusion] *Salmonella enteritidis* C50041 $\Delta slyD$ mutant strain and soluble SlyD protein was obtained, and the present study may provide a basis for further study of the role of SlyD in *Salmonella enteritidis*.

Keywords: *Salmonella enteritidis*, SlyD, gene knock-out, peptidal-prolyl cis-trans isomerase

(本文责编: 李磊)

Supported by the Key International Cooperation and Exchange Program of National Natural Science Foundation of China (31320103907), by the Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest (201403054), by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions and by the Research and Innovation Project for College Graduates of Jiangsu Province (KYLX15_1384)

*Corresponding author. Tel: +86-514-87971803; Fax: +86-514-87311374; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

Received: 3 November 2015; Revised: 10 January 2016; Published online: 22 January 2016