



## 铜绿假单胞菌表面(氧化)低密度脂蛋白配体的研究

李雨欣<sup>1,3</sup> 刘治<sup>1,3</sup> 杨金丽<sup>2</sup> 韩润林<sup>\*2,3</sup>

1 内蒙古农业大学生命科学学院 内蒙古 呼和浩特 010018

2 内蒙古农业大学兽医学院 内蒙古 呼和浩特 010018

3 内蒙古农业大学血浆脂蛋白免疫学研究中心 内蒙古 呼和浩特 010018

**摘要:** 【背景】研究发现铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)与(氧化)低密度脂蛋白(Low density lipoprotein, LDL/oxidized low density lipoprotein, oxLDL)具有特异性相互作用,有报道证实 *P. aeruginosa* 表达的 RahU 蛋白可以与 LDL/oxLDL 特异性结合。【目的】验证 RahU 蛋白是否是 *P. aeruginosa* 表面主要的 LDL/oxLDL 配体。【方法】大肠杆菌表达 RahU 蛋白(rRahU), ELISA 验证 rRahU 与 LDL/oxLDL 的相互作用。利用同源重组的方法构建 *RahU* 基因缺失突变株( $\Delta$ *RahU* 菌株)作为阴性对照菌株,制备小鼠抗 rRahU 抗体,经 Western Blot 及 ELISA 分别检测抗 rRahU 抗体与 *P. aeruginosa* 野生型菌株膜蛋白中 RahU 蛋白及菌体表面 RahU 蛋白的结合。通过 ELISA 方法对 *P. aeruginosa* 野生型菌株及  $\Delta$ *RahU* 菌株与 LDL/oxLDL 的结合差异进行比较,并对不同蛋白酶水解  $\Delta$ *RahU* 菌体表面蛋白后  $\Delta$ *RahU* 菌株与 LDL/oxLDL 结合能力的差异进行比较。【结果】经 ELISA 验证 rRahU 与 LDL/oxLDL 存在特异性结合。Western Blot 及 ELISA 方法证实小鼠抗 rRahU 抗体可以与 *P. aeruginosa* 野生型菌株膜蛋白中 RahU 蛋白及菌体表面 RahU 蛋白特异性结合,而不与  $\Delta$ *RahU* 菌株相互作用。*P. aeruginosa* 野生型菌株及  $\Delta$ *RahU* 菌株与 LDL/oxLDL 结合能力无显著差异,且蛋白酶水解后  $\Delta$ *RahU* 菌株与 LDL/oxLDL 的结合能力相近。【结论】RahU 蛋白是 *P. aeruginosa* 表面的 LDL/oxLDL 配体之一,但不是唯一的配体。

**关键词:** 铜绿假单胞菌, 低密度脂蛋白/氧化低密度脂蛋白, RahU 蛋白, 配体

## Detection of (oxidized) low-density lipoprotein binding ligand on *Pseudomonas aeruginosa*

LI Yu-Xin<sup>1,3</sup> LIU Zhi<sup>1,3</sup> YANG Jin-Li<sup>2</sup> HAN Run-Lin<sup>\*2,3</sup>

1 College of Life Sciences, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China

2 College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China

3 Research Center of Plasma Lipoprotein Immunology, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China

**Abstract:** 【Background】 *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) specifically interacts with (oxidized) low density lipoprotein (LDL/oxLDL), and RahU expressed by *P. aeruginosa* binds to LDL/oxLDL. 【Objective】 Our study investigated if RahU on *P. aeruginosa* was the major binding ligand for LDL/oxLDL.

\*Corresponding author: E-mail: han-runlin@163.com

Received: 16-10-2018; Accepted: 13-12-2018; Published online: 02-01-2019

\*通信作者: E-mail: han-runlin@163.com

收稿日期: 2018-10-16; 接受日期: 2018-12-13; 网络首发日期: 2019-01-02

**[Methods]** The interaction of recombinant RahU (rRahU) with LDL/oxLDL was detected by ELISA. Mouse anti-rRahU antibody was generated to determine if RahU was expressed on the membrane of the wild *P. aeruginosa* strain by Western-Blotting and ELISA. The affinity of LDL/oxLDL bind to wild *P. aeruginosa* strain and  $\Delta$ RahU strain (constructed as a negative control) was compared by ELISA. Influence of different protease digestion on the binding affinity of  $\Delta$ RahU strain to LDL/oxLDL was also compared by ELISA. **[Results]** Recombinant RahU specifically interacted with LDL/oxLDL. Western-Blotting and ELISA results revealed that anti-rRahU antibody bound to the membrane protein extracted from wild *P. aeruginosa* strain specifically, but not with  $\Delta$ RahU strain. Binding affinity of LDL/oxLDL with both wild *P. aeruginosa* strain and  $\Delta$ RahU strain made no significant difference. Protease digestion did not influence the binding of  $\Delta$ RahU strain to LDL/oxLDL. **[Conclusion]** RahU is one but not the unique ligand of LDL/oxLDL on *P. aeruginosa*.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, Low density lipoprotein/oxidized low density lipoprotein, RahU protein, Ligand

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*)是一种常见的条件致病菌,广泛分布于医疗器械、动物、植物及人体。约有 10%–15%的医源性继发感染是由 *P. aeruginosa* 引起的,免疫缺陷、烧伤、患有囊性纤维化及癌症等病人对 *P. aeruginosa* 易感<sup>[1-2]</sup>。*P. aeruginosa* 表达了多种毒力因子,其中最为重要的有脂多糖(Lipopoly-saccharide, LPS)和生物膜结构。生物膜的形成会导致 *P. aeruginosa* 由非粘液型菌株转变为粘液型菌株,其耐药性和粘附能力也会随之增强<sup>[3]</sup>。

RahU 蛋白是 *P. aeruginosa* 的一种毒性蛋白,由 *RahU* 基因编码,分子量大小为 14.85 kD,其表达与生物膜的形成、细菌的群体效应相关。RahU 蛋白属于杨树菇溶血素(Aegerolysins)蛋白家族,该蛋白家族的蛋白均与 LDL/oxLDL 特异性结合。有研究证实,RahU 蛋白与 LDL/oxLDL 特异性结合是因为其与 LDL/oxLDL 的 LysoPC 相互作用<sup>[4]</sup>。通过这一发现,我们对 *P. aeruginosa* 与 LDL/oxLDL 的结合进行了研究,发现了二者的特异性相互作用。然而,RahU 蛋白在不同菌株的表达差异显著,如果 RahU 蛋白是 *P. aeruginosa* 表面唯一的 LDL/oxLDL 配体,则 *P. aeruginosa* 与 LDL/oxLDL 的结合可能并不稳定。因此,本研究对 RahU 蛋白作为 *P. aeruginosa* 表面 LDL/oxLDL 配体的重要性进行了检测。

LDL/oxLDL 是与动脉粥样硬化形成密切相关的血浆脂蛋白,其主要功能是参与包括胆固醇在内

脂类的运输。除此之外,LDL/oxLDL 还可能是一种重要的免疫分子<sup>[5]</sup>,LDL/oxLDL 含量的升高可以上调一系列清道夫受体的表达,进而增强吞噬细胞对病原微生物的清除能力,LDL 受体(LDL-R)缺失的小鼠抗病原微生物感染的能力显著提高<sup>[6]</sup>。近年来,有研究发现通过与病原微生物的相互作用,LDL/oxLDL 还能发挥调理素功能,促进吞噬细胞对病原微生物的吞噬<sup>[7]</sup>,LDL/oxLDL 与病原微生物的相互作用可能是其抗感染免疫作用发挥的前提。

本研究对能与 LDL/oxLDL 特异性结合的 RahU 蛋白是否是 *P. aeruginosa* 膜表面唯一的 LDL/oxLDL 配体进行了研究,对 LDL/oxLDL 与 *P. aeruginosa* 相互作用的机制进行了探讨,这可能是对 LDL/oxLDL 具有抗 *P. aeruginosa* 感染能力机制的论证。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株及培养基

*P. aeruginosa* CMCC10104 菌株,中国菌种保藏中心;pEX18Tc、pUCGm 载体,武汉汉申生物科技有限公司;*E. coli* JM109、*E. coli* SM10 菌株,生工生物工程(上海)股份有限公司。LB 培养基(g/L):Tryptone 10.0, Yeast extract 5.0, NaCl 5.0, Agar (固体) 10.0。

### 1.2 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒小提试剂盒购自北京天根生物科技有限公司;LDL 购自 Alfa asar 公司;羊抗人 LDL 多抗、蛋白酶 K 及胰蛋白

酶购自 Sigma 公司; 驴抗羊 IgG-HRP 购自 R&D Systems; 山羊抗鼠 IgG-HRP 购自北京博奥森生物科技有限公司; Pierce<sup>®</sup> BCA 蛋白测定试剂盒购自 Thermo 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒购自 Promega 公司; 试验所用限制性内切酶均购自宝生物工程(大连)有限公司; 基因测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

基因扩增仪, 博日科技有限公司; 垂直流超净台、多功能酶标仪, Bio-Tek 公司; 台式冷冻离心机, Eppendorf 公司; 轨道型恒温摇床, 上海智诚分析仪器制造有限公司; 蛋白电泳槽、核酸电泳槽、电脑三恒多用电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 半干转膜仪, Hoefer 公司; 湿转仪, Bio-Rad 公司; 化学发光/荧光凝胶成像系统, Syngene 公司。

### 1.3 *RahU* 基因缺失突变株( $\Delta$ *RahU* 菌株)的构建

参照 Rao 等所述, 利用等位替换原理构建  $\Delta$ *RahU* 菌株<sup>[8]</sup>。LB 固体平板过夜活化-80 °C 冻存的 *P. aeruginosa* CMCC10104。次日, 挑取单菌落于 LB 液体培养基, 在恒温摇床中 37 °C、200 r/min 培养。培养至  $OD_{600}$  约为 0.8 左右, 将菌体收集后提取 *P. aeruginosa* 基因组 DNA。以提取得到的 DNA 为模板, 利用表 1 中的引物分别扩增 *RahUU* 及 *RahUD* 基因片段。PCR 反应体系(20  $\mu$ L): 模板 0.5  $\mu$ L, 2 $\times$ PCR master mix 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ mol/L 引物各 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 °C 1 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 50 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。得到的 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。

于 37 °C 用 *EcoR* I 及 *Kpn* I 限制性内切酶对 *RahUU* 片段及 pEX18Tc 质粒分别酶切 30 min,

酶切后的片段及质粒经凝胶回收、产物纯化后使用 T4 连接酶连接, 连接后的重组质粒命名为 pEX18*RahUU*。pEX18*RahUU* 质粒转化 *E. coli* JM109, 筛选阳性克隆并提取质粒。提取得到的 pEX18*RahUU* 质粒及 *RahUD* 片段分别用 *Kpn* I、*Hind* III 限制性内切酶在 37 °C 酶切 30 min, 酶切产物经凝胶回收、产物纯化后使用 T4 连接酶连接, 连接后的质粒命名为 pEX18*RahUUD*。pEX18*RahUUD* 质粒转化 *E. coli* JM109, 并将阳性克隆培养后提取质粒。将提取得到的 pEX18*RahUUD* 质粒及购买的 pUCGm 质粒用 *Kpn* I 限制性内切酶在 37 °C 酶切 30 min, 酶切产物经凝胶回收后, 用去磷酸化酶去磷酸化, T4 连接酶连接后命名重组质粒为 pEX $\Delta$ *RahU*::Gm。该质粒中插入了 *RahU* 基因上、下游同源臂及 830 bp 的 Gm 抗性基因, 为等位替换 *RahU* 基因的打靶质粒。重组质粒经转化 *E. coli* JM109 后筛选阳性克隆, 提取 pEX $\Delta$ *RahU*::Gm 质粒转化 *E. coli* SM10 菌株。

利用接合转移的方法将 *E. coli* SM10 菌株中的穿梭质粒 pEX $\Delta$ *RahU*::Gm 转化 *P. aeruginosa*, 利用含 Tc (50  $\mu$ g/mL)、Gm (150  $\mu$ g/mL) 和 Sp (25  $\mu$ g/mL) 的 LB 抗性平板筛选质粒插入后的 *P. aeruginosa*。*P. aeruginosa* 基因组 DNA 与打靶质粒发生交换的菌株用含 5% 蔗糖及 Gm (150  $\mu$ g/mL) 的 LB 平板筛选, 得到的菌落再分别划线培养于含 Gm (150  $\mu$ g/mL) 的 LB 平板与含 Tc (50  $\mu$ g/mL) 的 LB 平板, 能在含 Gm (150  $\mu$ g/mL) 的 LB 平板生长而不能在含 Tc (50  $\mu$ g/mL) 的 LB 平板上生长的菌落为发生双交换的目的菌株  $\Delta$ *RahU* 菌株。

表 1 构建  $\Delta$ *RahU* 菌株所用引物

Table 1 Primers for construction the  $\Delta$ *RahU* strain

Primers name	Primers sequence (5'→3')	PCR product	Size (bp)
<i>RahUU</i> -F	CGGAATTCGCTGGTGGAAAGCGAAGTG	Upstream of <i>RahU</i> gene	630
<i>RahUU</i> -R	CGGGGTACCGTCGATCTCCGTTAACCATGC	Upstream of <i>RahU</i> gene	630
<i>RahUD</i> -F	TTCTCCTGACGGTACCTGGA	Downstream of <i>RahU</i> gene	375
<i>RahUD</i> -R	CCCAAGCTTTGAACACCTCGAACCACCTCA	Downstream of <i>RahU</i> gene	375
pEX18Tc	GAAGATCTGTTGAATACTCATACTCTTC	Plasmid pEX18Tc	164
pEX18Tc	GAAGATCTTGTCAGACCAAGTTTACTCAT	Plasmid pEX18Tc	164

利用表 2 中的引物,以  $\Delta$ RahU 菌株的基因组 DNA 为模板,通过 PCR 扩增 Gm 抗性基因及 RahU 基因,鉴定  $\Delta$ RahU 菌株中 Gm 抗性基因的插入和 RahU 基因的消失。RT-PCR 方法分别扩增 *P. aeruginosa* 野生型菌株及  $\Delta$ RahU 菌株 cDNA 中 RahU 基因,检测基因敲除后 RahU 基因是否表达。

#### 1.4 小鼠抗 rRahU 抗体的制备

RahU 蛋白的重组表达方法同 Rao 等<sup>[8]</sup>的报道,以 *P. aeruginosa* 基因组 DNA 为模板,使用表 2 中扩增 RahU 片段的引物扩增 RahU 基因,该基因片段与 pET28b 表达载体连接后转化 *E. coli* Transseta(DE3) 菌株。向培养至对数期的 *E. coli* Transseta(DE3) 菌液中加 1 mmol/L IPTG 诱导表达 3 h,裂解细菌细胞后使用 TALON<sup>®</sup> Metal 亲和柱层析分离目的蛋白,目的蛋白冻存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。15% SDS-PAGE 电泳及 Western Blot 对 rRahU 蛋白的纯度及特异性进行分析, Pierce<sup>®</sup> BCA 蛋白测定试剂盒测定 rRahU 蛋白含量(结果未显示)。

购买 5–6 周龄小鼠采血清, ELISA 检测血清中无抗 *P. aeruginosa* 抗体。小鼠常规饲养,按照每只小鼠皮下注射 75  $\mu\text{g}$  免疫 206 佐剂乳化后的 rRahU 蛋白进行初免,同时对对照组小鼠每只注射相同体积乳化后 PBS (因 rRahU 由 PBS 稀释)。14 d 后小鼠皮下注射 50  $\mu\text{g}$  免疫乳化后 rRahU 蛋白进行第二次加强免疫,二免 14 d 后小鼠皮下注射 50  $\mu\text{g}$  免疫乳化后 rRahU 蛋白进行三免。免疫后小鼠眼部采血并分离血清,经 Protein G resin 纯化得到抗 rRahU 抗体和抗 PBS 抗体,纯化得到的抗体经 Western-Blot 和 ELISA 检测其特异性(结果未显示)。

#### 1.5 *P. aeruginosa* 野生型菌株及 $\Delta$ RahU 菌株膜蛋白的分离

培养 *P. aeruginosa* 野生型菌株及  $\Delta$ RahU 菌株各 100 mL 至对数期,即  $OD_{600}$  约为 0.9。4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, PBS 洗菌 3 次后, 500  $\mu\text{L}$  PBS 重悬,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻过夜。取出上述冻存菌液室温融化后, 分别加 2  $\mu\text{L}$  PMSF, 以及溶菌酶和 DNA 酶各 1  $\mu\text{L}$ , 室温脱色摇床作用 20 min 后, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、3 220 $\times g$  离心 15 min。收集上述离心后上清, 弃去沉淀。4  $^{\circ}\text{C}$ 、100 000 $\times g$  超速离心 6 h, 弃上清, 沉淀为菌体膜蛋白。膜蛋白分别用 500  $\mu\text{L}$  PBS 重悬。

#### 1.6 ELISA 检测 rRahU 蛋白与 LDL/oxLDL 的相互作用

将浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 rRahU 或 rTuf 按照每孔 100  $\mu\text{L}$  包被酶标板, 同时加阴性对照 PBS 包被酶标板, 室温下孵育 1.5 h。之后用 TBST 每孔 200  $\mu\text{L}$  洗板 3 次, 每孔加 200  $\mu\text{L}$  1% BSA-TBST 封闭 1.5 h。洗板 3 次后分别按每孔加终浓度为 1.0、0.5、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LDL/oxLDL 100  $\mu\text{L}$  (TBST 稀释), 室温下孵育 1.5 h。TBST 洗板 3 次。加入 1:10 000 稀释的羊抗人 LDL, 室温下孵育 1.5 h 后洗板 3 次。加入 1:1 000 稀释的驴抗羊-HRP, TBST 洗板 3 次后加显色液 TMB 底物 100  $\mu\text{L}$ , 室温孵育 5 min。每孔加终止液 100  $\mu\text{L}$ , 测定 450 nm 处吸光值。

#### 1.7 ELISA 及 Western Blot 检测 *P. aeruginosa* 菌株表面 RahU 蛋白的表达

*P. aeruginosa* 野生型菌株及  $\Delta$ RahU 菌株膜蛋白分别经 15% SDS-PAGE 电泳分离后, 恒压 100 V、30 min 转膜至 0.22  $\mu\text{m}$  NC 膜。一抗用小鼠抗 rRahU

表 2 扩增 RahU 基因及 Gm 基因所用引物

Table 2 Primers for amplifying the genes of RahU and Gm

Primers name	Primers sequence (5'→3')	PCR product	Size (bp)
RahU-F	GTTAACGGAATTTCGACATGGCATAACGCAG	RahU gene	411
RahU-R	GCTCCAGGTA <del>ACTCGAG</del> GGAGAAGCGGCCG	RahU gene	411
Gm-F	ATGTTACGCAGCAGCAACGAT	Gm resistance gene	534
Gm-R	TTAGGTGCGCGTACTTGGGT	Gm resistance gene	534

蛋白抗体检测其中的 RahU 蛋白, 小鼠抗 PBS 抗体作为阴性对照。二抗为山羊抗鼠 IgG-HRP, 之后加显色液于 G:BOX XT4 化学发光/荧光凝胶成像系统拍照。

ELISA 方法同 1.5, 用每孔 100  $\mu$ L *P. aeruginosa* 野生型菌株菌液或  $\Delta$ RahU 菌株菌液包被酶标板, 随后用抗体检测不同菌株表面 RahU 蛋白的表达情况, 一抗用小鼠抗 rRahU 蛋白抗体, 二抗为山羊抗鼠 IgG-HRP。

### 1.8 ELISA 检测 RahU 蛋白是否是 *P. aeruginosa* CMCC10104 菌株表面唯一 LDL/oxLDL 配体

用 100  $\mu$ L 每孔 *P. aeruginosa* CMCC10104 野生型菌株及该菌株 RahU 基因缺失突变株  $\Delta$ RahU 菌株菌液包被酶标板, 其余方法同 1.5。

按照每  $10^9$  CFU 加入蛋白酶 K (ProK) 50  $\mu$ g、胰蛋白酶(Trypsine) 50  $\mu$ g、ProK 和 Trypsine 各 50  $\mu$ g 对  $\Delta$ RahU 菌株进行处理, 对照组加入等体积的 PBS。37  $^{\circ}$ C 作用 30 min。之后按照每  $10^9$  CFU 加 2 mmol/L 的 PMSF 终止反应。得到的菌体经 PBS 悬浮后每孔 100  $\mu$ L 包被酶标板, 其余方法同 1.5。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\Delta$ RahU 菌株的鉴定

图 1A 为不同引物扩增  $\Delta$ RahU 菌株基因组 DNA 结果, 可以看出 Gm 抗性基因插入了  $\Delta$ RahU 菌株基因组, 而 RahU 基因在该菌株中消失。

图 1B 为扩增 *P. aeruginosa* 野生型菌株及  $\Delta$ RahU 菌株 cDNA 中 RahU 基因的结果, 可以看出, RahU 基因在野生型菌株中表达而在突变株中沉默, 证实  $\Delta$ RahU 菌株中 RahU 基因被敲除。

### 2.2 rRahU 蛋白与 LDL/oxLDL 的相互作用

ELISA 结果(图 2)显示, 与表达 rRahU 相同方法表达的 rTuf 与 LDL/oxLDL 不结合, 而 rRahU 与 LDL/oxLDL 结合且二者的结合能力与 LDL/oxLDL 浓度呈正相关, 为特异性结合, 证实本研究表达的 rRahU 具有生物学活性。

### 2.3 RahU 蛋白在 *P. aeruginosa* 细胞表面表达的鉴定

以 rRahU 蛋白为阳性对照,  $\Delta$ RahU 菌株膜蛋白为阴性对照, Western Blot 结果(图 3A)显示小鼠抗

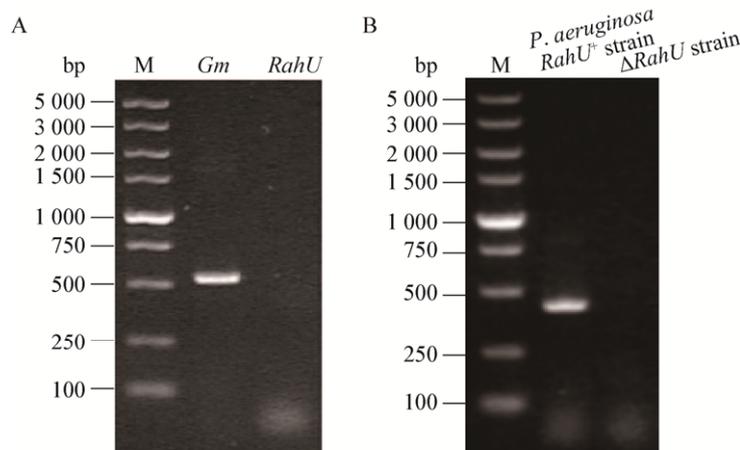


图 1 PCR 及 RT-PCR 对  $\Delta$ RahU 菌株的鉴定

#### Figure 1 Identification of $\Delta$ RahU strain with PCR and RT-PCR

注: M: DL5000 marker; Gm: 用 Gm 抗性基因引物扩增  $\Delta$ RahU 菌株基因组 DNA 中插入 Gm 抗性基因结果; RahU: 用 RahU 基因引物扩增  $\Delta$ RahU 菌株基因组 DNA 中 RahU 基因结果; *P. aeruginosa* RahU<sup>+</sup> strain: 用 RahU 基因引物扩增 *P. aeruginosa* 野生型菌株 mRNA 反转录后 cDNA 中 RahU 基因结果;  $\Delta$ RahU strain: 用 RahU 基因引物扩增  $\Delta$ RahU 菌株 mRNA 反转录后 cDNA 中 RahU 基因结果。

Note: M: DL5000 marker; Gm: Genome DNA of  $\Delta$ RahU amplified by primers of Gm; RahU: Genome DNA of  $\Delta$ RahU amplified by primers of RahU; *P. aeruginosa* RahU<sup>+</sup> strain: cDNA of *P. aeruginosa* wild strain reverse transcribed mRNA amplified by primers of RahU;  $\Delta$ RahU strain: cDNA of  $\Delta$ RahU strain reverse transcribed mRNA amplified by primers of RahU.

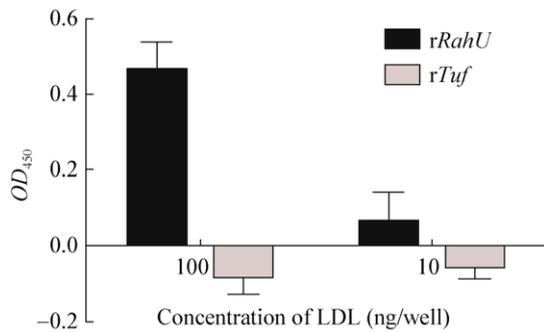


图2 rRahU 与 LDL/oxLDL 的结合

Figure 2 Binding of rRahU to LDL/oxLDL

rRahU 蛋白抗体与 *P. aeruginosa* 野生型菌株膜蛋白中的 RahU 蛋白特异性结合,图 3A 为以小鼠抗 PBS 抗体孵育的阴性对照组,图 3B 为以小鼠抗 rRahU 蛋白抗体孵育的实验组。ELISA 结果(图 3C)显示,小鼠抗 rRahU 蛋白抗体与 *P. aeruginosa* 野生型菌株相互作用,而不与  $\Delta$ RahU 菌株相互作用。Western

Blot 及 ELISA 试验均以小鼠抗 PBS 抗体作为阴性对照。证实 RahU 蛋白在 *P. aeruginosa* CMCC10104 菌体表面表达,为其表面的 LDL/oxLDL 配体之一。

## 2.4 RahU 蛋白对 *P. aeruginosa* CMCC10104 与 LDL/oxLDL 结合的影响

ELISA 结果(图 4)表明,RahU 基因缺失与否对 *P. aeruginosa* 和 LDL/oxLDL 的结合能力没有显著影响,RahU 蛋白不是 *P. aeruginosa* 表面唯一的 LDL/oxLDL 结合位点。

## 2.5 *P. aeruginosa* 表面其他 LDL/oxLDL 配体的研究

ELISA 结果(图 5)表明,不同蛋白酶水解  $\Delta$ RahU 菌株表面蛋白后, $\Delta$ RahU 菌株与 LDL/oxLDL 的结合能力无显著差异。该结果说明 *P. aeruginosa* 表面与 LDL/oxLDL 结合的配体可能还有非蛋白组分。

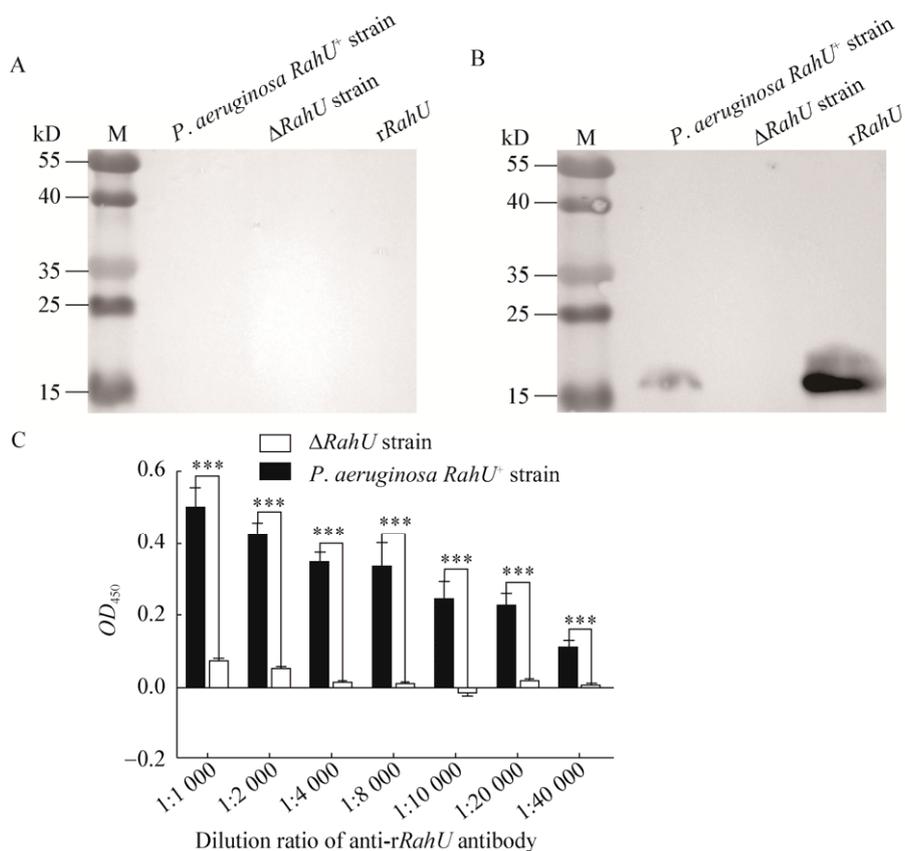


图3 ELISA 及 Western Blot 检测 *P. aeruginosa* 野生型菌株及  $\Delta$ RahU 菌株表面 RahU 蛋白的表达

Figure 3 Detection of RahU on *P. aeruginosa* wild strain and  $\Delta$ RahU strain membrane with ELISA and Western Blot

注:利用 Student *t* 检验对数据进行统计学意义分析,\*: $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

Note: A two tailed paired Student's *t*-test was used to determine statistical significance. \*:  $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

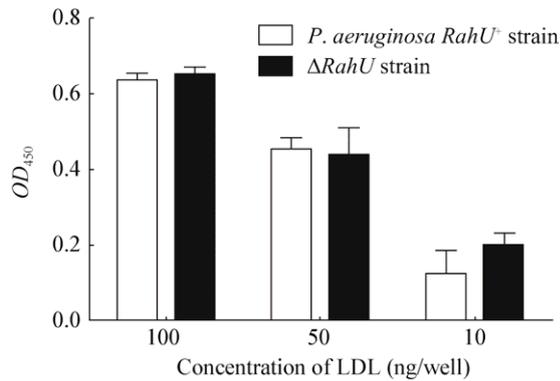


图 4 *P. aeruginosa* 野生型菌株和  $\Delta$ *RahU* 菌株与 LDL/oxLDL 的结合

Figure 4 Binding of *P. aeruginosa* wild strain and  $\Delta$ *RahU* strain to LDL/oxLDL

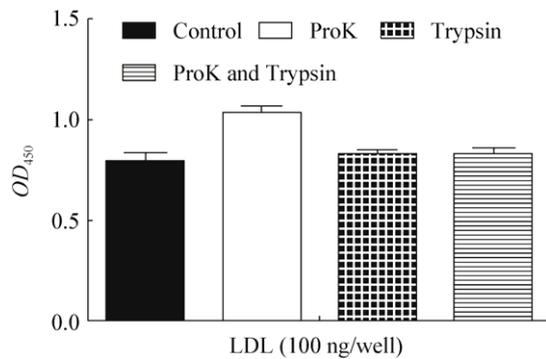


图 5 不同蛋白酶作用后  $\Delta$ *RahU* 菌株和 LDL/oxLDL 的结合

Figure 5 Binding of different protease digested  $\Delta$ *RahU* strain to LDL/oxLDL

### 3 讨论

大量研究证实 LDL/oxLDL 是一种重要的免疫分子<sup>[5]</sup>, 有研究证实 LDL/oxLDL 可以通过与 A 群链球菌的 I 型胶原样蛋白相互作用而发挥调理素功能, 促进吞噬细胞对该病原微生物的吞噬作用<sup>[7]</sup>。对 LDL/oxLDL 与其他病原微生物相互作用的研究可能是对 LDL/oxLDL 抗感染免疫机制新的补充。同时, 有研究证实, 很多能与 LDL/oxLDL 特异性结合的病原微生物感染都与动脉粥样硬化的形成有关<sup>[9-11]</sup>, 其中也包括 *P. aeruginosa*<sup>[12]</sup>。对 LDL/oxLDL 与病原微生物相互作用的研究可能也是对动脉粥样硬化等疾病形成机理的全新阐述。

本研究中 *RahU* 蛋白属于 *P. aeruginosa* 的毒力蛋白之一, LDL/oxLDL 与该蛋白的相互作用可能会改变 *P. aeruginosa* 感染宿主的能力<sup>[8]</sup>。*RahU* 蛋白在不同的 *P. aeruginosa* 菌株中表达差异显著, 其非粘液型菌株中该蛋白的表达量是粘液型菌株的 4-8 倍, 同时该蛋白在非粘液型菌株的细胞质及细胞膜上均有表达, 而在粘液型菌株中仅在细胞质中表达<sup>[4]</sup>。本研究证实, *RahU* 蛋白并不是 *P. aeruginosa* 细胞膜表面唯一的 LDL/oxLDL 结合位点。这就说明在不能表达 *RahU* 蛋白的 *P. aeruginosa* 菌株中, 也有其他的 LDL/oxLDL 配体参与 *P. aeruginosa* 与 LDL/oxLDL 的相互作用。*P. aeruginosa* 与 LDL/oxLDL 的特异性结合可能与菌株的不同无关, 通过对酶处理后  $\Delta$ *RahU* 菌株和 LDL/oxLDL 的结合无差异可以看出, *P. aeruginosa* 表面的 LDL/oxLDL 配体可能不仅有蛋白组分, 同时 LDL/oxLDL 与该病原微生物的相互作用是非常稳定的。

*P. aeruginosa* 含有  $6.3 \times 10^7$  个碱基对, 共有 5 570 个开放式阅读框。在这些开放式阅读框中, 编码外膜蛋白的基因就有 150 个之多<sup>[13]</sup>, 因此虽然 *RahU* 蛋白是 *P. aeruginosa* 表面的 LDL/oxLDL 受体之一, *P. aeruginosa* 表面也可能还有与 LDL/oxLDL 相互作用的膜蛋白。有研究称, 某些革兰氏阴性菌表面的 LPS 成分可以与 LDL/oxLDL 特异性结合<sup>[14]</sup>, 而 LPS 同样是 *P. aeruginosa* 的菌表面组分之一, 因此 *P. aeruginosa* 表面的 LPS 结构可能也是 LDL/oxLDL 配体之一。除此而外, *P. aeruginosa* 表面还有生物膜结构, 生物膜的成分包括蛋白、脂类及核酸等<sup>[15]</sup>。研究表明, 脂类、蛋白以及核酸都有可能与 LDL/oxLDL 相互作用<sup>[15,16]</sup>, 因此 *P. aeruginosa* 表面的 LDL/oxLDL 配体可能也与生物膜有关。以上结论还有待于进一步的研究证实。

### 4 结论

本研究证实 *P. aeruginosa* 表达的 *RahU* 蛋白是 *P. aeruginosa* 表面的 LDL/oxLDL 配体之一, 然而 *P. aeruginosa* 表面还有其他成分的 LDL/oxLDL 配

体。*P. aeruginosa* 与 LDL/oxLDL 的结合由多种机制导致且非常稳定。

## REFERENCES

- [1] Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, et al. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms[J]. *Nature*, 2000, 407(6805): 762-764
- [2] Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2005, 11(S4): 17-32
- [3] Cayci YT, Coban AY, Gunaydin M. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates[J]. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2014, 32(3): 285-289
- [4] Rao J, DiGiandomenico A, Unger J, et al. A novel oxidized low-density lipoprotein-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microbiology*, 2008, 154(2): 654-665
- [5] Han RL. Plasma lipoproteins are important components of the immune system[J]. *Microbiology and Immunology*, 2010, 54(4): 246-253
- [6] Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, et al. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host[J]. *Journal of Lipid Research*, 2004, 45(7): 1169-1196
- [7] Zhou LL, Liu L, Yang JL, et al. LDL acts as an opsonin enhancing the phagocytosis of group A *Streptococcus* by monocyte and whole human blood[J]. *Medical Microbiology and Immunology*, 2016, 205(2): 155-162
- [8] Rao J, DiGiandomenico A, Artamonov M, et al. Host derived inflammatory phospholipids regulate *rahU* (PA0122) gene, protein, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Cellular Immunology*, 2011, 270(2): 95-102
- [9] Guevara Jr JG, Prashad N, Ermolinsky B, et al. Apo B100 similarities to viral proteins suggest basis for LDL-DNA binding and transfection capacity[J]. *Journal of Lipid Research*, 2010, 51(7): 1704-1718
- [10] Boddi M, Abbate R, Chellini B, et al. HCV infection facilitates asymptomatic carotid atherosclerosis: preliminary report of HCV RNA localization in human carotid plaques[J]. *Digestive and Liver Disease*, 2007, 39(S1): S55-S60
- [11] Magen E, Borkow G, Bentwich Z, et al. Can worms defend our hearts? Chronic helminthic infections may attenuate the development of cardiovascular diseases[J]. *Medical Hypotheses*, 2005, 64(5): 904-909
- [12] Turkay C, Saba R, Pahin N, et al. Effect of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection on the development of atherosclerosis in a rat model[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2004, 10(8): 705-708
- [13] 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
- [14] Kitchens RL, Thompson PA. Impact of sepsis-induced changes in plasma on LPS interactions with monocytes and plasma lipoproteins: roles of soluble CD14, LBP, and acute phase lipoproteins[J]. *Journal of Endotoxin Research*, 2003, 9(2): 113-118
- [15] Lawrence JR, Swerhone GDW, Leppard GG, et al. Scanning transmission X-ray, laser scanning, and transmission electron microscopy mapping of the exopolymeric matrix of microbial biofilms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5543-5554
- [16] Surewaard BGJ, Reindert N, Spaan AN, et al. Inactivation of staphylococcal phenol soluble modulins by serum lipoprotein particles[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(3): e1002606