

网络出版时间: 2020/5/29 13:04 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200527.1643.030.html>

◇技术与方法◇

牙龈卟啉单胞菌蛋白酶 Ltp1 的表达、纯化及酶学性质研究

顾前程¹, 夏荣¹, 孔文文²

摘要 采用重组法构建 Ltp1 的原核表达载体,并将其转化至 *E. coli* BL21(DE3) 中进行异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG) 诱导过表达,然后用镍柱层析法粗纯化,分子筛纯化得到目的蛋白,以 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 分析表达产物;将目的蛋白和底物对硝基苯磷酸二钠显色反应分析其活性。SDS-PAGE 结果显示有与目的蛋白理论相对分子质量一致的表达条带;Western blot 分析证实该蛋白带有 6 个组氨酸(His) 标签的目的蛋白,能够催化磷酸单酯的活性;计算出米氏常数(Km) 和最大反应速率(V_{max}) 分别为 70.4 μmol 、51.1 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$, pH 5.0 ~ 6.0 催化活性最高,在 37 ~ 50 $^{\circ}\text{C}$ 具有较高活性。

关键词 牙龈卟啉单胞菌; Ltp1(PG1641); 蛋白表达纯化; 牙周病; 酶学研究

中图分类号 R 781

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2020) 06 - 0974 - 05
doi: 10. 19405/j. cnki. issn1000 - 1492. 2020. 06. 030

牙周病是人类口腔的常见病和多发病。牙菌斑生物膜的形成和堆积是牙周病的直接原因,菌斑微生物可通过自身代谢产物引起组织破坏;也可通过刺激或改变宿主的自身免疫反应间接危害宿主^[1]。牙龈卟啉单胞菌是目前公认的牙周致病菌^[2]。其致病性主要体现在:表面结构和蛋白酶直接起着黏聚分子的作用;可产生多种胞外蛋白酶、内毒素、磷酸酶,均可对牙周组织产生破坏作用^[3]。而酪氨酸蛋白酶(tyrosine protein phosphatase, PTPs) 正是这些毒力因子中的一种。Maeda et al^[4] 发现,在牙龈卟啉单胞菌基因组中,存在 PG1641 基因,推测它表达了一种低分子量 Ltp1。关于该蛋白酶的酶学性质研究, Maeda et al^[4] 采用了突变法表达此蛋白;并以孔雀石绿检测法,证实其为酪氨酸磷酸酶蛋白,同

时检测不同金属离子对酶活性的影响,但未对目的蛋白的反应温度和相应 pH 做相应检测。该研究通过生物学技术对目的基因进行直接合成,并以原核表达系统表达出数量较多、纯度较高的目的蛋白,简化步骤方法,同时对其进行活性检测及晶体学初筛,为后续蛋白结构研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器 大肠杆菌 BL21(DE3) (上海 Invitrogen); pET29a 载体改造后的 p29 载体(北京 Novagen); 质粒抽提试剂盒(美国 Axygen); PCR 回收试剂盒(美国 Axygen)。引物与目的基因: PCR 扩增引物、目的基因 PG1641 由通用生物系统(安徽)有限公司合成;序列测定:上海生物工程技术服务公司、通用生物系统(安徽)有限公司。化学试剂:克隆位点(5' NdeI 和 3' XhoI)、Luria-Bertani(LB) 培养基、琼脂、卡那霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) (美国 Merck 公司)、HEPES 缓冲液(pH7.4)、1 mol/L 咪唑、5 mol/L NaCl、Buffer: 50 mm HEPES pH7.4 150 mm NaCl、蛋白纯化洗脱液: 50 mm HEPES pH7.4 150 mm NaCl 40 ml、20 A: 20 mm 咪唑 30 ml(5 mol/L 咪唑 120 μl 加 buffer 至 30 ml)、20B: 20 mm 咪唑 30ml(5 mol/L 咪唑 120 μl 加 buffer 至 30 ml)、300 mm 咪唑 6 ml(5 mol/L 咪唑 360 μl buffer 5640 μl)、小鼠抗 His 标签单抗、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG、ECL 底物发光显影定影试剂盒(以上实验材料均来自美国 Sigma 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 基因合成 参考 GeneBank 上 PG1641 目的基因序列(编号为: NC_002950.2) ,对 PG1641 目的基因序列分析后进行密码子优化,使其适合于原核表达系统,交于通用生物系统(安徽)有限公司合成(合同编号 G0131961) ,将 PG1641 构建于 pET19-b 载体上,克隆位点分别是 NdeI-XhoI。

1.2.2 LTP1 蛋白重组质粒的构建 将合成的基因载体,用 CloneExpress 同源重组方法重新构建质粒

2019 - 09 - 02 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号: 1508085MH156)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第二附属医院口腔科,合肥 230601

² 中国科学技术大学结构与生物化学实验室,合肥 230601

作者简介:顾前程,男,硕士研究生;

夏荣,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: xiarongqh@ aliyun. com

表达系统 pET29-PG1641-His。在设计引物时要设计目的基因以及载体线性化的引物,目的基因的正反向引物要和载体的线性化引物有 15~20 bp 的同源序列,这样可以在重组酶 *Exnase II* 的催化下发生同源重组。根据 *Ltp1* PG1641(513 bp) 基因序列设计上下游引物,上游引物 PG1641-S: 5'-AG-GAGATATACATATGAAGCCGCATAAAATTCTGTT-3'; 下游引物 PG1641-A: 5'-GGTGGTGCT-GCTCGAGATCGCAGGCGCTCAGACTAC-3'。

1.2.3 重组质粒载体的扩增与鉴定 ① 将同源重组法构建的 pET29-PG1641-His 载体转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态中,将转化后产物均匀涂布在含卡那霉素抗性的 LB 固体培养基上,置于 37 °C 恒温培养箱过夜。② 筛选阳性克隆并进行菌液 PCR,同时将菌液做琼脂糖电泳检测,并送测序(上海生工生物有限公司),在 NCBI 上以 Blast 软件进行序列对比和分析,将正确结果的菌液进行质粒返还,将回收的质粒进行琼脂糖电泳。

1.2.4 *Ltp1* 蛋白的表达与纯化

1.2.4.1 *Ltp1* 的转化与表达 将返还验证后的重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态中,之后将转化的菌液加入 LB 液体培养基中(卡那霉素抗性),37 °C 摇床培养至吸光度(optical density, OD)_{600 nm}: 0.6~0.8 时,加入 IPTG,16 °C 摇床上诱导过夜表达。Beckman 离心机(4 000 r/min, 15 min) 收菌。每罐菌体以 20 ml 20 mm Tris-HCl pH7.5 150 mm NaCl 重悬,分装至 10 个 15 ml 试管中, -30 °C 冰箱保存。

1.2.4.2 菌液破碎与制样 取上述菌液,化冻后倒出半管菌液至 50 ml 小烧杯中,加入 50 mm HEPES pH7.4 150 mm NaCl 至 30 ml。将小烧杯放置冰上,进行冰浴超声破碎(功率 42%, 总时间 30 min, 破 2 s, 停 2 s), 破碎后菌液离心(12 000 r/min, 30 min), 沉淀用 buffer 重悬,将上清液和沉淀分别制样。

1.2.4.3 *Ltp1* 镍柱层析粗纯化 将上清液样品进行镍离子亲和层析:先用 10 倍柱体积 50 mm HEPES pH7.4 150 mm NaCl 冲洗平衡镍柱,然后加入上清液样品,设置流速 5~6 s 1 滴,流完后先用 40 ml 上述 buffer 流速设置 2~3 s 1 滴,之后分别用 2 管 30 ml 20 mm 咪唑洗脱杂蛋白流速 2~3 s 1 滴,最终用 6 ml 300 mm 咪唑洗脱下目的蛋白(流速 5~6 s 1 滴) 并且分别制样,和上述上清液、沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.4.4 *Ltp1* 分子筛细纯化 将 300 mm 咪唑洗

脱下的目的蛋白分装在 6 个 1.5 ml EP 管中,12 000 r/min 离心 10 min,之后用分子筛层析进一步分离细纯化。先用配置好且已经超声除气好的 buffer (50 mm HEPES pH7.4 150 mm NaCl) 冲洗 S75 凝胶层析柱,平衡柱子,流出速度为 1.0 ml/min,柱压为 0.7 MPa,冲洗体积为 120~140 ml。然后将 6 ml 150 mm 咪唑洗脱下且离心好的蛋白质样品通过注射器上样,设置流速 1.0 ml/min,柱压 0.7 MPa,每管接样体积 1.4 ml,紫外灯 280 nm 进行检测。大约当冲洗体积是 70~90 ml 时紫外 OD 值发生变化,软件上出现一个尖锐峰,收集此峰范围内 EP 管所接样品并标记。对所收集样品紫外分光光度仪测浓度并分别制样跑电泳检测。

1.2.5 Western blot 鉴定重组蛋白 将上述细纯化收集的蛋白样品加入浓缩管(美国 Millipore),截留分子量大小 10 ku 蛋白质,4 °C、3 200 r/min 离心机离心 10 min。紫外分光光度仪测 OD 值,直至蛋白质浓度浓缩达 10 mg/ml 以上。采用 Western blot 法对浓缩样品进行检测:一抗为小鼠抗 His 标签单抗,二抗为稀释为 1:3 000 的 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG,将细纯化浓缩后的目的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,用 PVDF 膜转膜,脱脂牛奶 37 °C 封闭 1 h,洗 3 次;加入小鼠抗 His 标签单抗(一抗)(1:2 000),室温结合 1 h,洗膜 5 次;加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(二抗)(1:3 000),室温结合 45 min,洗 5 次,ECL 底物发光显影定影试剂盒显色,使用 X 线曝光分析结果。

1.3 *Ltp1* 酶学研究

1.3.1 OD 变化 室温下,以对硝基苯磷酸二钠为显色底物溶液,与纯化所得目的蛋白反应,以 NaOH 终止反应,使用 DU800 监测 A405 nm OD 变化^[5]。实验组为底物对硝基苯磷酸盐(p-nitrophenyl phosphate p-NPP) 溶液同时加入 PG1641 目的蛋白参与反应,空白组为单独底物 p-NPP 溶液不加目的蛋白 PG1641。

1.3.2 不同反应温度对蛋白活性影响 将 1.3.1 中温度分别设为 37、50、75 °C,加入目的蛋白,其他条件不变,进行显色反应。

1.3.3 不同 pH 对蛋白活性影响 配置不同 pH 反应液, pH 分别为 5.0、6.0、7.4、9.0,加入目的蛋白,其他条件不变进行显色反应。

1.3.4 酶活测定 在室温下,50 mm HEPES 150 mm NaCl pH7.4 条件下,将细纯化目的蛋白与不同浓度对 p-NPP 反应,测 OD 值,最后应用双倒数作图

计算 Km 和 Vmax 值。

2 结果

2.1 Ltp1 表达载体的构建 图 1 为琼脂糖电泳结果: 从 NCBI 上得知 PG1641 目的基因为 513 bp, 琼脂糖电泳结果与目的基因大小基本一致, 在 500 多 bp 左右; 图 2 显示, 质粒回收后琼脂糖电泳结果也与实际结果一致。图 3 以生物学信息软件 ExPASy 软件生物学信息软件分析知 Ltp1 蛋白 PI 值约为 4.99, 理论相对分子量约为 18.75 ku。

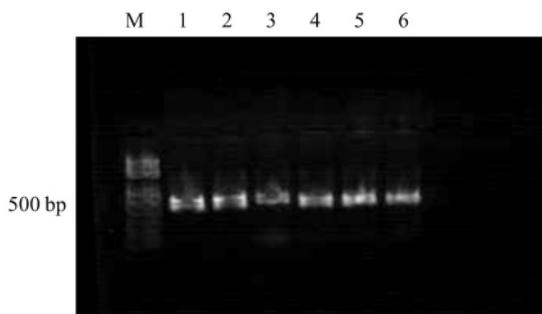


图 1 p29-PG1641 菌液 PCR 后 DNA 琼脂糖电泳

M: DNA Marker; 1、2、3、4、5、6: 均是菌液 PCR 后目的基因 PG1641

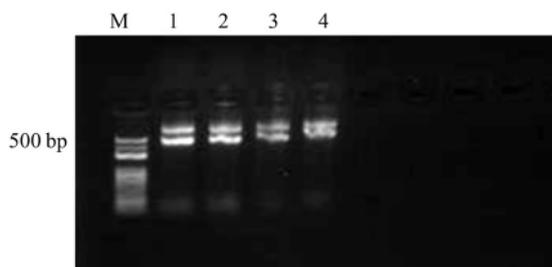


图 2 质粒回收后琼脂糖电泳

M: DNA Marker; 1、2、3、4: 回收的 PG1641 目的基因

Compute pI/Mw

Theoretical pI/Mw (average) for the user-entered sequence:

```

1Q      2Q      3Q      4Q      5Q      6Q
MKPHKILFVC LGNICKRSPSA EAVFRSYVEE QGHADRFHID SAGLSNYHQG EKADARMRAH
7Q      8Q      9Q      10Q     11Q     12Q
AARRGYDLTS LSRPVEYEDF ERFDYIIGMD FANRRLQEL APTEEAAAKI RLMTDFSSSG
13Q     14Q     15Q     16Q
IHDHVPDPYV GGASGFELVL DILEECTAGL FSYLTFPHDN SLSACD

```

Theoretical pI/Mw: 4.99 / 18754.83

图 3 ExPASy 软件分析结果

2.2 Ltp1 蛋白的大量表达 将构建成功的原核表达载体 p29-PG1641-His 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 经过 IPTG 诱导表达, 收菌、离

心破碎、纯化后, SDS-PAGE 结果显示: 与理论值 18.75 ku 大小基本符合, 且粗纯化和细纯化后在上清液和 300 mm 咪唑洗脱液中均存在目的蛋白 Ltp1。图 4 为镍柱亲和层析粗纯化 SDS-PAGE 结果: 可以观察到上清液和 300 mm 咪唑洗脱液条带范围大约在 18.4 ~ 25.0 ku 之间; 图 5 为分子筛细纯化样品 SDS-PAGE 结果: 可以观察到管数 51、53、55、57、61、63、65 均有目的蛋白。

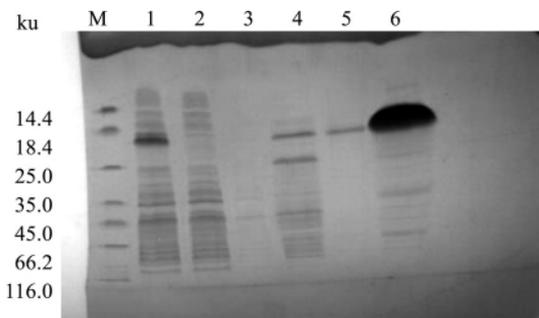


图 4 镍柱层析样品粗纯化 SDS-PAGE

M: 蛋白 Marker; 1: 上清液; 2: 流穿; 3: buffer; 4: 20 mm 咪唑洗脱液; 5: 20 mm 咪唑洗脱液; 6: 300 mm 咪唑洗脱液

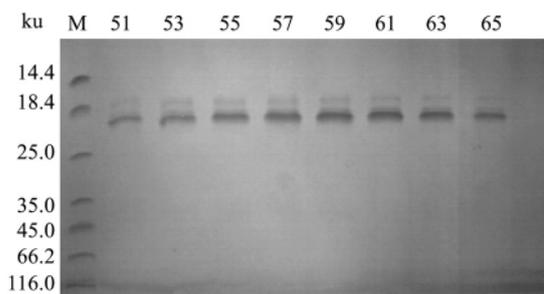


图 5 分子筛尖峰下细纯化样品 SDS-PAGE

M: 蛋白 Marker; 51、53、55、57、59、61、63、65: 分别为分子筛 A280 尖峰下对应样品管数

2.3 Western blot 测定 将分子筛细纯化样品浓缩后的目的蛋白进行 Western blot 分析, 显色后在 PVDF 膜上出现单一条带 (图 6), 表明表达的目的蛋白确实是带有 His 标签的 Ltp1 目的蛋白。

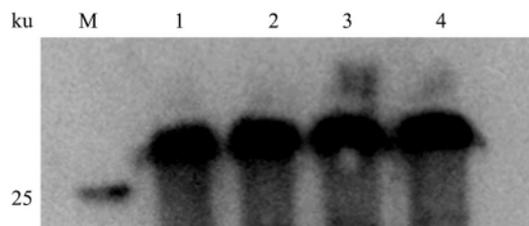


图 6 Western blot 结果

M: 蛋白 Marker (Easy-see marker); 1、2、3、4: 均是分子筛样品浓缩后 PG1641 蛋白

2.4 Ltp1 酶学检测结果 Ltp1 可催化 p-NPP 产生黄色产物 p-NP。纯化后所得目的蛋白具有典型磷酸酶活性(图7),且在 pH 5.0~6.0 均具有较高催化活性(图8) 随着 pH 升高,活性逐渐降低;37~50 °C 时,活性最高(图9)。

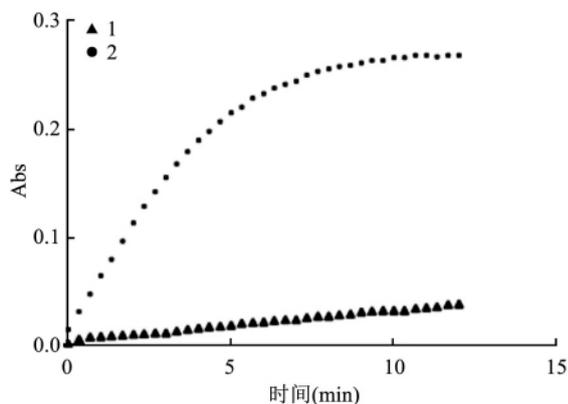


图7 酶活反应
1: 空白组; 2: 实验组

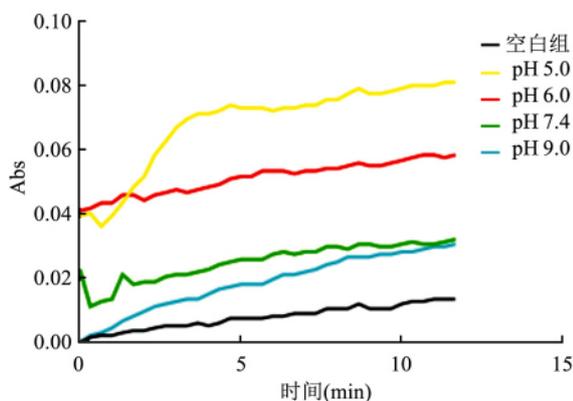


图8 pH 检测

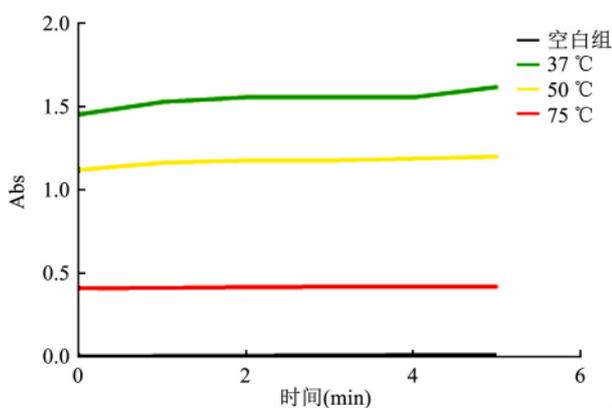


图9 温度检测

2.5 酶活结果 在不同浓度 p-NPP 底物条件下,与重组目的蛋白反应,测定其初速度(1/V),以 1/V

和 1/S 做双倒数图,求得重组蛋白的 K_m 和 V_{max} 分别为: $70.4 \mu\text{mol}$ 和 $51.1 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 。

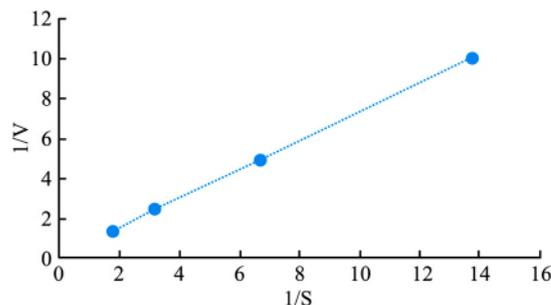


图10 米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} 测定
1/V: 反应速度倒数; 1/S: 底物浓度倒数

3 讨论

牙龈卟啉单胞菌是口腔中一种革兰阴性厌氧菌,与齿垢密螺旋体、福赛坦氏菌共称为“红色复合体”和晚期牙周病变密切相关^[6]。具有对牙周组织高度破坏性,这主要归因于其特有的毒力因子库。而 Ltp1 正是毒力因子库的多功能调节剂:首先这种病原体不产生铁载体,相反,它以特定的菌毛蛋白,促进 Ltp1 释放,以此来加速血红素的摄取,最终调节胞外多糖合成^[7]; Ltp1 还可以促进牙龈素 (RgpA、RgpB 或 Kgp) 等蛋白酶的产生,这些蛋白酶为糖酵解提供了肽底物,用于降解牙龈纤维和宿主产生的免疫效应分子,并且牙龈素已被公认为是生物体的主要毒力决定因素^[8-9]; Ltp1 还可参与约束单种菌斑生物膜和异型菌斑微生物膜的累积,例如在牙龈卟啉单胞菌和戈登链球菌异型微生物社区中,第一步就是由 2 个不同的黏附素受体介导的共价黏附作用^[10];除此之外, Ltp1 还可干扰细菌间 AI-2 信号的传导,主要是通过负调节 LuxS 的转录,从而使细菌黏附受到干扰^[11]。

本研究将牙龈卟啉单胞菌目的基因 PG1641 重组至带有 His 标签的 pET29 载体上,利用大肠杆菌 BL21 进行诱导表达。SDS-PAGE 电泳检测到相对分子量约为 18.75 ku 的目的蛋白,Western blot 鉴定了该重组蛋白。通过与其底物 p-NPP 反应得知其酶活 K_m 和 V_{max} 分别为 $70.4 \mu\text{mol}$ 、 $51.1 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 在 pH 5.0~6.0 和 37~50 °C 具有较高活性,后续实验将对其进行进一步优化,以期获得纯度更高且不含标签的目的蛋白。为下一步晶体学初筛,晶体条件的探索奠定基础,这样就可以从结构生物学角度明晰其致病机理,也可为牙周炎的免疫治

疗、靶向药物研究提供方向。

参考文献

- [1] 何金枝,徐欣,周学东. 口腔微生物与全身健康研究进展[J]. 微生物与感染,2017,12(3):139-45.
- [2] 潘亚萍,刘静波. 牙龈卟啉单胞菌研究进展[J]. 国际口腔医学杂志,2011,38(2):125-7.
- [3] How K Y, Song K P, Chan K G. Porphyromonas gingivalis: an overview of periodontopathic pathogen below the gum Line [J]. Front Microbiol, 2016, 7: 53.
- [4] Maeda K, Tribble G D, Tucker C M, et al. A Porphyromonas gingivalis tyrosine phosphatase is a multifunctional regulator of virulence attributes [J]. Mol Microbiol, 2008, 69(5): 1153-64.
- [5] 刘秀菊. 碱性磷酸酶的酶学性质研究及其在心肌标志物免疫检测中的应用[J]. 中国医学工程, 2018, 26(9): 12-6.
- [6] Zhu Y, Dashper S G, Chen Y Y, et al. Porphyromonas gingivalis and treponema denticola synergistic polymicrobial biofilm development [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71727.
- [7] Olezak T, Simpson W, Liu X, et al. Iron and heme utilization in Porphyromonas gingivalis [J]. FEMS Microbiol Rev, 2005, 29(1): 119-44.
- [8] Lamont R J, Jenkinson H F. Life below the gum Line: pathogenic mechanisms of Porphyromonas gingivalis [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, 62(4): 1244-63.
- [9] Paramonov N, Rangarajan M, Hashim A, et al. Structural analysis of a novel anionic polysaccharide from Porphyromonas gingivalis strain W50 related to Arg-gingipain glycans [J]. Mol Microbiol, 2005, 58(3): 847-63.
- [10] Chawla A, Hirano T, Bainbridge B W, et al. Community signaling between Streptococcus gordonii and Porphyromonas gingivalis is controlled by the transcriptional regulator CdhR [J]. Mol Microbiol, 2010, 78(6): 1510-22.
- [11] Scheres N, Lamont R J, Crielaard W, et al. LuxS signaling in Porphyromonas gingivalis-host interactions [J]. Anaerobe, 2015, 35(Pt A): 3-9.

Expression, purification and enzymatic properties of protease Ltp1 from *porphyromonas gingivalis*

Gu Qiancheng¹, Xia Rong¹, Kong Wenwen²

(Dept of Stomatology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Laboratory of Structure and Biochemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230601)

Abstract The prokaryotic expression vector of Ltp1 was constructed by recombinant method, and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) for over-expression induced by isopropyl- β -D-galactoside (IPTG), then the target protein was coarsely purified by nickel column chromatography and fine purified by molecular sieve, and the product was expressed by SDS-PAGE electrophoresis and Western blot. The activity of the target protein was analyzed by color reaction with disodium p-nitrophenyl phosphate. SDS-PAGE results showed that there was an expression band consistent with its theoretical relative molecular weight. Western blot analysis confirmed that the protein was indeed a target protein with six histidine (His) tags which could catalyze the activity of phosphate monoester. The Michaelis constant (Km) and the maximum reaction rate (Vmax) were calculated to be 70.4 μ mol and 51.1 μ mol/(L·min) respectively, which had the highest catalytic activity at pH 5.0~6.0 and 37~50 $^{\circ}$ C.

Key words *porphyromonas gingivalis*; Ltp1 (PG1641); protein expression and purification; periodontal disease; enzymatic activity analysis