

牙龈卟啉单胞菌 PrtC 蛋白体外表达、纯化及功能初探

高晓雪¹ 汪颖² 夏荣¹

摘要 目的 牙龈卟啉单胞菌 PrtC 蛋白体外表达纯化及功能初探。方法 全基因合成牙龈卟啉单胞菌(*P. gingivalis*) ATCC33277 中 *prtC* 基因, 构建重组表达载体 p29-*prtC*, 生物信息学分析和低温诱导表达、SDS-PAGE、Western blot 鉴定, 酶解法检测胶原酶的功能。结果 成功构建了 PrtC 蛋白原核表达载体, 在大肠杆菌表达体系内获得可溶蛋白表达, 通过亲和层析和分子筛层析纯化出高纯度且较稳定的 PrtC 蛋白, 并且实验证明它具有降解胶原蛋白的能力。结论 体外生化实验说明 PrtC 蛋白具有胶原蛋白酶活性, 并且为后续解析 PrtC 蛋白的结构奠定了基础。

关键词 牙龈卟啉单胞菌; PrtC 蛋白; 胶原酶; 蛋白表达

中图分类号 R 781

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)10-1515-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.007

牙周炎是一种由细菌感染引起的牙周支持组织破坏的慢性进行性疾病^[1]。牙龈卟啉单胞菌(*P. gingivalis*) 被认为是牙周病主要致病菌之一^[2]。*P. gingivalis* 能够分泌多种毒力因子, 产生多种胞外蛋白酶, 如牙龈素、胶原酶、肽酶等, 可对牙周组织产生破坏^[3]。蛋白酶可以降解多种蛋白质和多肽底物, 破坏牙周组织细胞, 诱导与组织破坏、骨吸收相关的致炎细胞因子的产生^[4]。而 PrtC 蛋白正是这些蛋白酶中的一种。

1992 年, Kato et al^[5-6] 发现胶原酶 PrtC 来源于牙龈卟啉单胞菌 ATCC53977, 能够降解 I 型胶原蛋白, 在牙周组织的破坏和牙周病的发展过程中发挥重要作用。然而有研究^[7] 表明 *prtC* 基因编码的产物不能降解胶原的底物以及没有与真核动物胶原酶相似的 Zn²⁺ 结合区域, 因此对其是否是真正的胶原酶地位提出了质疑。该研究以牙龈卟啉单胞菌

ATCC33277 PrtC 蛋白为研究对象, 通过原核表达体系, 体外表达出 PrtC 蛋白, 并验证其是否具有降解胶原的功能, 以期获得较好的蛋白质晶体为将来设计分子药物提供结构基础。

1 材料与方法

1.1 材料 包含 *prtC* 基因全长的 PUC57 克隆质粒(上海生物工程技术服务公司合成); PCR 引物(南京擎科生物科技有限公司合成); 克隆载体 p29(美国 Invitrogen 公司的 pET29b 载体改造); PCR 试剂盒(美国 Promega 公司); DNA 回收试剂盒(上海华舜生物工程公司); 镍离子亲和层析、预装柱凝胶过滤层析 HiLoad 16/60 Superdex 200(美国 GE Healthcare 公司); DNA 测序(上海生物工程技术服务公司); 无抗性 Top10 菌株及克隆、质粒扩增选用无抗性 BL21(DE3)(美国 Invitrogen 公司); 胶原蛋白 I 型(美国 Solarbio 公司); 抗 His 标签抗体、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 *prtC* 基因的生物信息学分析 利用 ProtParam 软件对 PrtC 蛋白序列进行理化性质分析, 包括氨基酸组成、分子量、半胱氨酸的个数等, 并利用 ProtScale 软件分析基因表达产物各氨基酸的亲水性/疏水性, 应用 Multalin interface page 进行序列比对, BLAST 预测其结构域。

1.2.2 *prtC* 基因分子克隆 全基因合成牙龈卟啉单胞菌 ATCC33277 的 *prtC* 基因序列(AP009380.1) 密码子优化后用 CloneExpress 同源重组方法构建质粒。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。Primer5 软件设计 *prtC* 基因引物, 上游引物: 5'-AAGAAGG-GAGATATACATATGAAAGAAATGAACGTGAAT-3'; 下游引物: 5'-GTGGTGGTGGTGTCTCGAGTTCTTCACGTTTATCGAAACGG-3'。p29 载体线性化上游引物: 5'-CTCGAGCACCACCACCACCACCAC-3', 下游引物: 5'-ATGTATATCTCCCTTCTT-3'。PCR 扩增外源

2020-06-21 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 230026

作者简介: 高晓雪, 女, 硕士研究生;

夏荣, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xiarongqh@aliyun.com

基因片段后,通过凝胶电泳确定 PCR 产物并利用 PCR 清洁试剂盒进行产物回收。p29 载体线性化产物使用 DpnI 酶在 37 °C 水浴下处理 2 h,并在重组酶 Exnase II 作用下将目的基因片段与线性化处理载体进行连接。转化到 Top10 感受态菌株,进行菌液 PCR 检测。依据核酸电泳结果选取菌液 PCR 中呈阳性的菌液进行测序。

1.2.3 PrtC 蛋白的小量原核表达检测和大量表达纯化 将构建成功的重组质粒分别转入 BL21 (DE3) 和 pKY206 (DE3) 感受态细胞中,其中大肠杆菌表达菌株 BL21 添加了 T7 聚合酶基因,为 T7 表达系统而设计的,而表达菌株 pKY206 带有质粒表达分子伴侣,能够帮助蛋白质折叠。分别在 37 °C 和 16 °C 条件下诱导表达 4 h 和 20 h。将上清液和沉淀分别制蛋白样,进行 SDS-PAGE 检测。按照表达检测摸索的蛋白最佳表达条件,进行扩大培养。将扩大培养后收集到的菌块,使用预冷的缓冲液 A (20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 14 mmol/L β-MER, 1 mmol/L EDTA-Na₂, 5% glycerol pH7.5) 进行超声破碎,12 000 r/min 离心后用 40 mmol/L 咪唑的缓冲液 A 洗脱杂蛋白,最后用 400 mmol/L 咪唑缓冲液 B (20 mmol/L Tris, 100 mmol/L NaCl, 14 mmol/L β-MER, 1 mmol/L EDTA-Na₂, 5% glycerol pH7.0) 洗脱目的蛋白并收集,在缓冲液 B 的环境中上样至分子筛 Superdex 200,收集蛋白样品,使用 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 Western blot 鉴定纯化的 PrtC 蛋白 切取纯化 PrtC 重组蛋白的 SDS-PAGE 所需条带,250 mA、60 min 转印至硝酸纤维素膜。5% 脱脂奶粉摇床上 37 °C 封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次; 加入 1 : 2 000 稀释的抗 His 标签抗体为一抗, 37 °C 孵育 1 h。洗膜后加入 1 : 3 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗, 37 °C 孵育 45 min。ECL 底物发光显影定影试剂盒显色,使用 X 线曝光分析结果。

1.2.5 PrtC 蛋白胶原酶功能实验 将蛋白稀释到 1 mg/ml, eppendorf 离心机 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 吸出转移至干净灭菌 EP 管中。称取 3 mg 胶原蛋白溶于 1 ml TES buffer。分别设置五个时间梯度 (10、14、18、24、32 h), 反应体系设为 10 μl。将胶原蛋白、PrtC 蛋白各自的对照组, 胶原与 PrtC 蛋白混合的实验组同时放入 30 °C 恒温水浴反应直到实验结束后, 加入 1 μl 的 EDTA-Na₂ 终止反应, 再加入 5 × loading buffer, 制取蛋白样, 10% SDS-PAGE 鉴定。

2 结果

2.1 PrtC 蛋白的生物信息学分析结果 *prtC* 基因编码的蛋白质包含 417 个氨基酸, 分子量为 47 ku, 理论等电点为 6.2, 有 9 个 Cys。应用 ProtScale Server 进行亲水性/疏水性预测, 多肽链第 100、103 位的 I、D 亲水性最强 (-2.378), 第 404 位的 R 疏水性最强 (1.800), 其亲水性氨基酸数目多于疏水性氨基酸 (图 1)。Multalin interface page 序列比对结果显示, 来源于牙龈卟啉单胞菌 ATCC33277 的 PrtC 氨基酸序列比 ATCC53977 在 N 端多出 83 个氨基酸残基, 相似度为 72.4% (图 2)。BLAST 预测其有两个结构域, 分别是 N 端蛋白酶 U32 家族 (Peptidase_U32 superfamily) 结构域 (10 ~ 362 位), 推测其可能为胶原酶的催化结构域, C 端翻译因子 (Translation_Factor_II_) 结构域 (331 ~ 402 位) (图 3)。

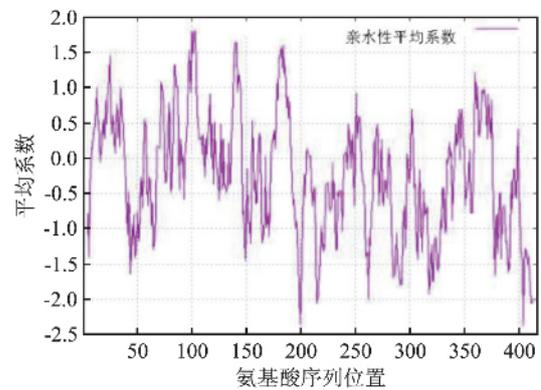


图1 亲水性/疏水性预测结果

2.2 PrtC 蛋白表达载体的构建 以 PUC57 质粒载体为 PCR 模板, PCR 扩增得到约 1 251 bp 的目的片段, p29 载体线性化扩增到约 5 370 bp, 其大小均与预期值相符 (图 4)。通过重组酶体系将载体和基因片段连接后, 转化到感受态 Top10。挑取单克隆, 菌液 PCR 结果 (图 5), 阳性结果显示测序正确。

2.3 PrtC 蛋白的小量表达检测和大量表达纯化 从 SDS-PAGE 结果中明显可见目的蛋白表达, 在 45 ku 上方有一条蛋白条带, 其大小与 PrtC 蛋白的分子量相符。由于大肠杆菌表达菌株 pKY206 分子伴侣与目的蛋白大小相近, 会产生干扰, 因此选择 BL21 表达菌株 16 °C 这个条件进行扩大培养。见图 6。将重组质粒 p29-*prtC* 转化到表达菌株 BL21 培养后使用 0.2 mmol/L IPTG 诱导重组蛋白表达。使用 400 mmol/L 咪唑缓冲液 A 经镍柱把目的蛋白洗脱

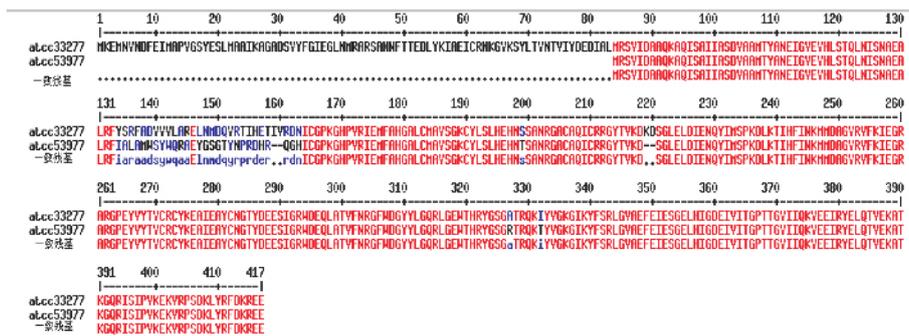


图2 不同菌株 PrtC 蛋白序列比对

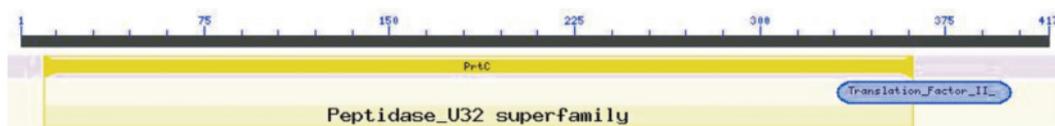


图3 结构域预测

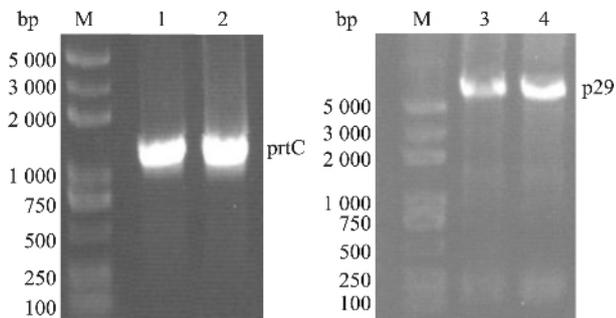


图4 PCR 扩增结果

M: DNA Marker; 1,2: prtC PCR 产物; 3,4: p29 线性化产物

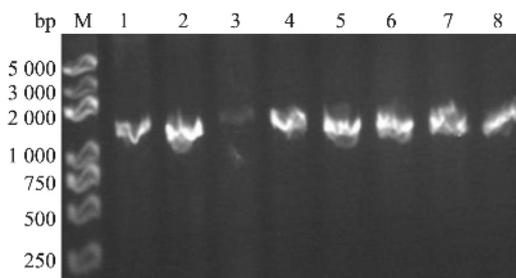


图5 菌液 PCR

M: DNA Marker; 1~8: 菌液 PCR 产物

下来,电泳结果见图7,由 SDS-PAGE 可知目的蛋白的纯度大于 95%。

使用分子筛 Superdex200 进行纯化, A280 吸收监测显示: 目的蛋白 PrtC 峰型对称, 出峰位置在 65 ml, 通过标准曲线($Velution = 289.8 - 43.2 \times \log Mr$) 计算出 PrtC 蛋白在分子筛上显示出的分子量是 160 ku, PrtC 单体的分子量是 47 ku 表明 PrtC 蛋白以三

体形式存在于溶液中。但分子筛出峰较宽,表明蛋白状态较好,可用于晶体学研究(图8)。

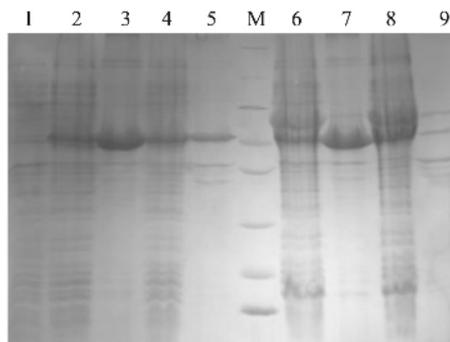


图6 PrtC 表达检测 SDS-PAGE 分析

M: Marker 由上到下依次为 116,66.2,45,35,25,18.4 和 14.4 ku; 1: 本底; 2: BL21 表达菌株 37 °C 上清液; 3: BL21 表达菌株 37 °C 沉淀; 4: BL21 表达菌株 16 °C 上清液; 5: BL21 表达菌株 16 °C 沉淀; 6: pKY206 表达菌株 37 °C 上清液; 7: pKY206 表达菌株 37 °C 沉淀; 8: pKY206 表达菌株 16 °C 上清液; 9: pKY206 表达菌株 16 °C 沉淀

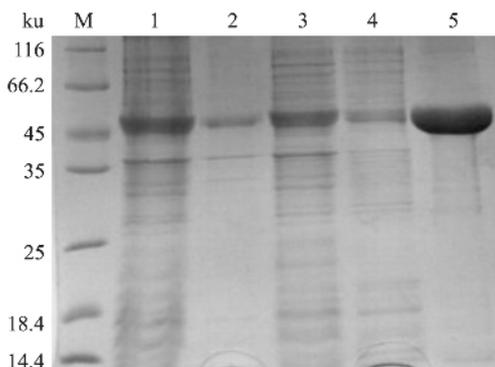


图7 PrtC 镍柱亲和层析蛋白电泳图

M: 蛋白 Marker; 1: 上清液; 2: 沉淀; 3: 流穿; 4: 40 mmol/L 咪唑; 5: 400 mmol/L 咪唑

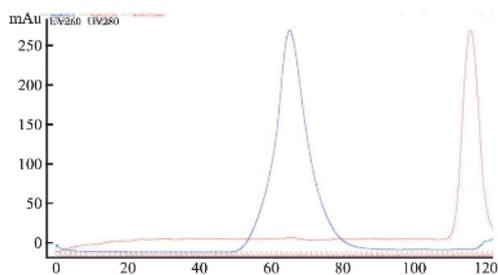


图8 分子筛 Superdex200 16/60 GL 的 A280 吸收峰

2.4 Western blot 鉴定纯化的 PrtC 蛋白 PrtC 重组蛋白经过在大肠杆菌体内破碎离心、Ni²⁺ 柱亲和层析 洗脱液中得到被纯化的 6 × His-PrtC 重组蛋白。以鼠抗 His Tag 单克隆抗体为一抗 进行 Western blot 检测 其结果显示了纯化的蛋白为 PrtC 重组蛋白(图9)。

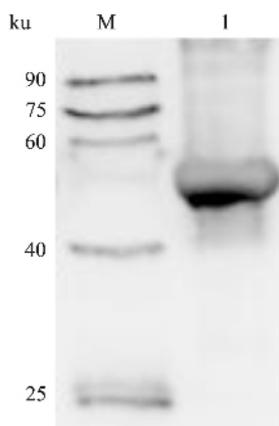


图9 Western blot 结果
M: 蛋白 Marker; I: PrtC 蛋白

2.5 PrtC 蛋白胶原酶功能实验结果 由 10% SDS-PAGE 可知 随着时间的增长 实验组 PrtC 蛋白加入胶原蛋白溶液后 在 32 h 胶原蛋白的条带变得非常的浅 而且在 35 ku 可见一条带 推测可能是胶原蛋白发生降解产生。而作为对照组的 PrtC 蛋白和胶原蛋白从实验开始就放入 30 °C 水浴锅直到结束 它们的条带几乎没有变化 也没有出现降解条带 因此证明 PrtC 蛋白具有降解胶原蛋白的能力(图10)。

3 讨论

P. gingivalis 是一种革兰阴性厌氧杆状细菌 已从晚期成人牙周炎的病变中分离出来。*prtC* 基因序列是来自于已经被完全测序的全基因组牙龈卟啉单胞菌 ATCC33277 菌株^[8] , 而牙龈卟啉单胞菌 ATCC53977 这个菌株的全基因组序列并没有测序完成。生物信息学分析: PrtC 蛋白的氨基酸序列中

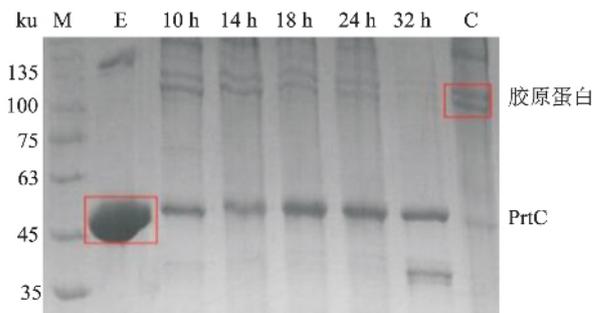


图10 PrtC 蛋白酶解 SDS-PAGE

M: 对照组; E: PrtC 蛋白; C: 胶原蛋白; 实验组: 10 h、14 h、24 h、32 h

大部分为亲水性氨基酸,可获得可溶性表达。来源于牙龈卟啉单胞菌 ATCC33277 的 PrtC 蛋白氨基酸序列比 ATCC53977 的氨基酸序列在 N 端多出 83 个残基,第 133 ~ 163 位氨基酸组成有明显不同,尽管 ATCC53977 被证明有胶原酶活性,但 ATCC33277 是否有此功能,还没有研究证实。BLAST 发现 PrtC 蛋白有两个结构域,分别是蛋白酶 U32 家族和翻译因子,可见 N 端的 U32 蛋白酶家族结构域保守,是蛋白酶活性中心。蛋白酶 U32 家族中第一个被解析的结构是来自于甲烷嗜热菌中的基因 mk0906 编码的蛋白酶 U32 结构域,揭示 U32 蛋白酶结构域是一个 TIM-桶状结构,该蛋白的四级结构是个二聚体。序列比对发现 Mk0906 与牙龈卟啉单胞菌序列的相似性低于 20%,所以 Mk0906 不能降解 I 型胶原蛋白^[9]。并且也有研究^[10-11]表明 *P. gingivalis* 可以通过影响宿主细胞基质金属蛋白酶(MMP)的表达、激活和抑制来诱导宿主胶原降解。研究人员提出 PrtC 蛋白可能与 *P. gingivalis* 或宿主细胞的脂多糖或 MMP 产生的其他因子联合作用,在牙周炎的发生发展过程中起作用^[12-13]。因此对 *prtC* 基因产物在胶原分解活性中的作用提出了质疑^[14]。本实验初步证明 PrtC 蛋白能降解 I 型胶原蛋白,后续将通过同位素标记的方法继续验证胶原酶降解胶原的功能。本研究同样也使用了微流控晶体初筛机器人(Mosquito)进行了晶体的初筛,没有发现晶体形成,于是将 PrtC 蛋白氨基酸序列与其他物种中的同源蛋白的氨基酸序列进行比对,结果显示这些序列非常保守,只有 N 端的几个氨基酸序列同源性较低,后期考虑设计 N 端的截短版、加配体等方法筛晶体。

本研究将 *prtC* 基因连接到 p29 质粒,得到的重组质粒能够表达含 6 × His 标签的重组蛋白。将重组质粒转化到表达菌株大肠杆菌 BL21,使用 IPTG 诱导表达重组蛋白,然后再用镍柱亲和层析法、分子

筛层析(Superdex 200) 预装柱纯化, Western blot 验证目的蛋白。通过胶原酶功能实验, 初步证明牙龈卟啉单胞菌 ATCC33277 PrtC 蛋白能够将 I 型胶原蛋白降解。由于目前没有人解析 PrtC 蛋白的晶体结构, 而本实验中也没有得到蛋白晶体, 所以将继续尝试使蛋白的状态更好, 更稳定、均一, 为得到蛋白晶体并解析结构, 了解其在牙周病发生中致病机制和研制临床药物提供理论基础。

参考文献

- [1] Petersen P E, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: The WHO approach [J]. *J Periodontol*, 2005, 76(12): 2187-93.
- [2] Bostanci N, Belibasakis G N. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen [J]. *FEMS Microbiol Lett* 2012, 333(1): 1-9.
- [3] Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, et al. *Porphyromonas gingivalis*: Major periodontopathic pathogen overview [J]. *J Immunol Res*, 2014, 2014: 476068.
- [4] Potempa J, Pike R, Travis J. The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain [J]. *Infect Immun*, 1995, 63(4): 1176-82.
- [5] Kato T, Takahashi N, Kuramitsu H K. Sequence analysis and characterization of the *Porphyromonas gingivalis prtC* gene, which expresses a novel collagenase activity [J]. *J Bacteriol*, 1992, 174(12): 3889-95.
- [6] Takahashi N, Kato T, Kuramitsu H K. Isolation and preliminary characterization of the *Porphyromonas gingivalis prtC* gene expressing collagenase activity [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1991, 68(2): 135-8.
- [7] Norris J M, Love D N. The association of two recombinant proteinases of a feline strain of *Porphyromonas gingivalis* with periodontal disease in cats [J]. *Vet Microbiol*, 2000, 71(1): 69-80.
- [8] Naito M, Hirakawa H, Yamashita A, et al. Determination of the genome sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in *P. gingivalis* [J]. *DNA Res*, 2008, 15(4): 215-25.
- [9] Schacherl M, Montada A A, Brunstein E, et al. The first crystal structure of the peptidase domain of the U32 peptidase family [J]. *Acta Crystallogr D*, 2015, 71(12): 2505-12.
- [10] Holt S C, Kesavalu L, Walker S, et al. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* [J]. *Periodontol* 2000, 1999, 20(1): 168-238.
- [11] Zhou J, Windsor L J. *Porphyromonas gingivalis* affects host collagen degradation by affecting expression, activation, and inhibition of matrix metalloproteinases [J]. *J Periodontal Res*, 2006, 41(1): 47-54.
- [12] Chen L L, Yan J. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide activated bone resorption of osteoclasts by inducing IL-1, TNF, and PGE [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(7): 614-8.
- [13] Sigusch B W, Guntzsch A, Pflitzner A, et al. Enhanced root planning and systemic metronidazole administration improve clinical and microbiological outcomes in a two-step treatment procedure [J]. *J Periodontol* 2005, 76(6): 991-7.
- [14] Kuramitsu H K, Yoneda M, Madden T. Proteases and collagenases of *Porphyromonas gingivalis* [J]. *Adv Dent Res*, 1995, 9: 37-40.

Prokaryotic expression, purification and function of *prtC* gene in *Porphyromonas gingivalis*

Gao Xiaoxue¹, Wang Ying², Xia Rong¹

¹Dept of Stomatology, The Secnd Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Laboratory of Biochemistry&Structural Biology, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract Objective To explore the expression and purification of PrtC protein from *Porphyromonas gingivalis* and its function *in vitro*. **Methods** The whole gene was used to synthesize *prtC* gene in ATCC33277 of *Porphyromonas gingivalis*, and the recombinant expression vector p29-*prtC* was constructed. Bioinformatics analysis, low-temperature induced expression, SDS-PAGE and Western blot identification were performed, and the function of collagenase was detected by enzymatic hydrolysis. **Results** The prokaryotic expression vector of collagenase protein PrtC was successfully constructed, and the soluble protein expression was obtained in the expression system of *E. coli*. The protein PrtC with high purity and stability was purified by affinity chromatography and molecular sieve chromatography, and it was proved to have the ability to degrade collagen. **Conclusion** PrtC protein expressed by prokaryotic recombinant protein had collagenase activity, which laid a foundation for subsequent analysis of PrtC structure.

Key words *Porphyromonas gingivalis*; PrtC; collagenase; protein expression