

DOI:10.13350/j.cjpb.230907

• 论著 •

牙龈卟啉单胞菌 pPGN 蛋白的原核表达、纯化及生物信息学分析*

郭法谋, 王新, 付博, 杨晨光, 孙红宾**

(郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 河南郑州 450000)

【摘要】 目的 孢子相关重复(Sporulation-related repeat, SPOR)结构域作为一种小肽聚糖结合结构域,在细胞分裂过程中起着重要作用。来自牙龈卟啉单胞菌的 pPGN 蛋白含有 SPOR 结构域,但其结构和功能尚不清楚。本研究原核表达、纯化 pPGN 蛋白,并进行生物信息学分析,为新型药物靶点的研发提供参考。方法 构建 pET-28a(+)-pPGN 表达载体,以大肠埃希菌为宿主菌异源诱导表达目的蛋白,经 Ni-NTA 亲和层析及分子筛纯化后使用 ITC 进行功能初探,采用生物信息学方法预测分析其理化性质与结构功能。结果 1% 琼脂糖凝胶电泳分析显示,重组表达载体构建成功;SDS-PAGE 电泳显示纯化得到较高纯度的 pPGN 蛋白单体;ITC 显示 pPGN 蛋白与 N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)、N-乙酰胞壁酸(NAM)之间不存在相互作用关系。生物信息学分析 pPGN 蛋白为碱性稳定性蛋白,无跨膜区域,含有 24 个磷酸化位点和一个保守结构域(SPOR 结构域)。SPOR 结构域蛋白比对分析显示,pPGN 蛋白与 RlpA(6i09-A)和 CwlC(1x60-A)蛋白的三级结构高度相似。分子对接分析显示 pPGN 蛋白与三糖(NAM-NAG-NAM)相互作用的残基主要为 R100、R105、R139,且作用于两端的 NAM,与 pPGN 蛋白相互作用的蛋白有 10 种。结论 pET-28a(+)-pPGN 表达载体在原核系统(大肠埃希菌)中得到高效表达,纯化获得具有高纯度的 pPGN 蛋白。分子对接分析其含有与 NAM-NAG-NAM 相结合的作用位点残基,为该蛋白的结构与功能研究奠定了基础,也为新型药物靶点的研发提供了一条新思路。

【关键词】 牙龈卟啉单胞菌;pPGN 蛋白;SPOR 结构域;表达纯化;生物信息学

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)09-1028-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Sep;18(9):1028-1033, 1038.]

Prokaryotic expression, purification and bioinformatics analysis of pPGN protein in *Porphyromonas gingivalis*

GUO Famou, WANG Xin, FU Bo, YANG Chenguang, SUN Hongbin (Department of Biology, College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450000, Henan, China)***

【Abstract】 **Objective** The Sporulation-related repeat (SPOR) domain plays an important role in cell division as a small peptidoglycan binding domain. The pPGN protein from *Porphyromonas gingivalis* contains the SPOR domain, but its structure and function are unknown. In this study, prokaryotic expression and purification of pPGN protein were carried out and bioinformatics analysis was carried out to provide a reference for the development of new drug targets.

Methods The expression vector of pET-28a(+)-pPGN was constructed, with *Escherichia coli* as the host bacterium heterologous induced expression of the target protein. After Ni-NTA affinity chromatography and molecular sieve purification, ITC was used to conduct preliminary functional exploration. Finally, bioinformatics methods are used to predict and analyze its physicochemical properties and structural functions. **Results** The electrophoresis analysis of 1% agarose gel showed that the recombinant expression vector was successfully constructed. SDS-PAGE electrophoresis showed that pPGN protein monomers of higher purity were obtained after purification by affinity chromatography and molecular sieve. ITC showed that there was no interaction between pPGN protein and N-acetylglucosamine (NAG) and N-acetylmuramic acid (NAM). Bioinformatics analysis pPGN protein is a basic stable protein with no transmembrane region, containing 24 phosphorylation sites and a conserved domain (SPOR domain). SPOR domain protein alignment analysis showed that the pPGN protein was highly similar to the tertiary structure of RlpA(6i09-A) and CwlC(1x60-A) proteins. Molecular docking analysis showed that the residues of pPGN protein interacting with trisaccharides (NAM-NAG-NAM) were mainly R100, R105, R139, and acted on NAM at both ends, and there were 10 proteins interacting with pPGN protein. **Conclu-**

* **【基金项目】** 河南省自然科学基金项目(No. 212300410415);河南省高等学校重点科研项目计划(No. 19A416008)。

** **【通讯作者】** 孙红宾, E-mail: hbsun@zzuli.edu.cn

【作者简介】 郭法谋(1984-),男,河南宁陵人,博士,讲师。研究方向:蛋白质结构与功能、生物催化与转化。E-mail: guofamou@zzuli.edu.cn

sion The pET-28a(+)-pPGN expression vector is efficiently expressed in the prokaryotic system (*Escherichia coli*), and the pPGN protein with high purity is purified. Molecular docking analysis contains site residues bound to NAM-NAG-NAM, which lays the foundation for the study of the structure and function of the protein, and also provides a new idea for the development of new drug targets.

【Key words】 *Porphyromonas gingivalis*; pPGN protein; SPOR domain; expression purification; bioinformatics

慢性牙周炎是常见的口腔感染性疾病,约占牙周炎的95%,多发于成年人,尤其在35岁以上人群慢性牙周炎的患病率显著上升,表现为牙周的支持组织破坏,严重者可导致牙龈脱落^[1]。牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)是牙周感染的重要病原菌,该菌为革兰阴性、杆状专性厌氧菌,从蛋白质分解产物、血红素和维生素K中获得代谢能量以促进其生长。除了引起牙周炎外,牙龈卟啉单胞菌还与多种全身性疾病有关,如高血压、动脉粥样硬化、心肌梗死和消化系统肿瘤等^[2-3]。牙龈卟啉单胞菌感染主要采用抗生素治疗,如氟喹诺酮类药物、阿奇霉素、甲硝唑和塞克硝唑等。但随着耐药菌的出现,影响了抗生素的治疗效果。因此,探索新的药物靶点和治疗方法具有重要意义。

PGN蛋白是具有168个氨基酸的蛋白,本研究前期合成了23-168位的氨基酸,命名为pPGN,其C端含有一个SPOR结构域。SPOR结构域是由70个氨基酸组成的一种小肽聚糖(PG)结合结构域,该结构域广泛存在于细菌蛋白中^[4]。每个结构域包括一个 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ 二级结构,能够组装成由两个 α 螺旋支撑的四股反平行 β 片,该结构模型属于核糖核蛋白(RNP)折叠超家族^[5-6]。RlpA、FtsN、DamX、DedD等4种含有SPOR结构域的蛋白,虽然它们的作用存在差异,但都与细胞分裂相关联^[7-9]。pPGN是一种来自牙龈卟啉单胞菌且含有SPOR结构域的蛋白质,但其结构、相互作用蛋白及其在细胞分裂过程中的作用尚不清楚。因此,对pPGN蛋白的深入研究有助于了解牙龈卟啉单胞菌的致病过程,同时为新药的研发提供一条新的思路。

本实验以大肠埃希菌为宿主菌构建pET-28a(+)-pPGN表达载体,经异丙基- β -D-半乳糖苷(IPTG)诱导表达pPGN蛋白,采用亲和层析和分子筛方法进行纯化,并进行生物信息学分析,为该蛋白的结构和功能研究奠定基础。

材料与方 法

1 材 料

1.1 载体、蛋白及宿主菌 大肠埃希菌(*Escherichia coli*)DH5 α 和BL21(DE3)感受态细胞由本实验室冻存。pPGN蛋白及pET-28a(+)载体由南京金斯瑞生

物科技公司合成。

1.2 主要试剂和仪器 Ni-NTA填料、卡那霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)及SanPrep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)和N-乙酰胞壁酸(NAM)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;凝血酶购于北京索莱宝科技有限公司。其他试剂均为国产分析纯。超净工作台为苏州苏洁净化设备有限公司生产;恒温培养箱为上海新苗医疗器械制造有限公司生产;恒温水浴锅购于上海一恒科学仪器有限公司;震荡摇床购于上海知楚一期有限公司;高速冷冻离心机为贝克曼库尔特(英国)股份有限公司生产;AKTA蛋白纯化仪为美国GE Healthcare公司生产;紫外凝胶成像仪(Tanon-3500)为上海天能公司生产;蛋白电泳仪为北京六一仪器厂生产;超声波细胞破碎仪购于宁波新芝生物科技有限公司。

2 方 法

2.1 pPGN重组表达载体的构建 以大肠埃希菌为宿主菌对pPGN蛋白编码序列进行优化,所得序列经合成后通过Nde I和Xho I酶切位点克隆到pET-28a(+)载体中,得到重组表达载体pET-28a(+)-pPGN(图1)。重组表达载体还含有6 \times His标签和凝血酶(Thrombin)酶切位点,可用于Ni-NTA亲和层析纯化,以及纯化后去除6 \times His标签。基因的合成与构建由南京金斯瑞生物科技有限公司协助完成。

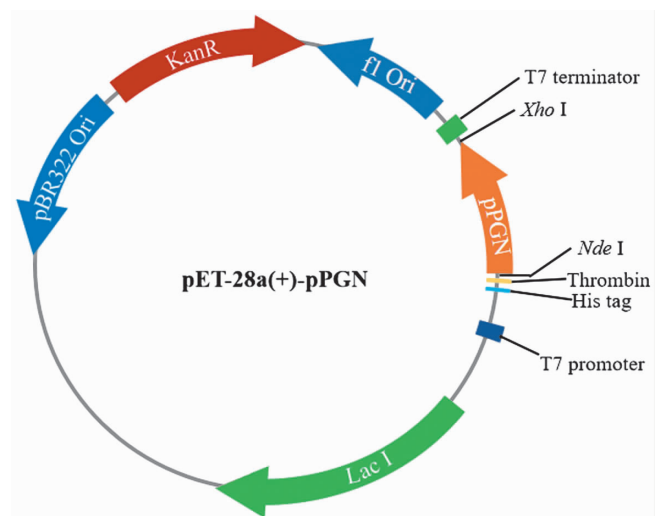


图1 重组表达载体pET-28a(+)-pPGN构建图
Fig. 1 Construction diagram of recombinant expression vector pET-28a(+)-pPGN

2.2 pET-28a(+)-pPGN 的转化与鉴定 从-80 ℃冰箱中取出 DH5 α 感受态细胞,每 100 μ L DH5 α 感受态细胞中加入 2 μ L pET-28a(+)-pPGN,混匀,于冰上静置 30 min,置于 42 ℃水浴锅中热激 45 s,冰上静置 5 min。加入 900 μ L LB 培养基,于 37 ℃、180 r/min 摇床中震荡培养 45 min 后,取适量菌液涂布于含有 50 μ g/mL 卡那霉素的固体 LB 平板上,37 ℃恒温培养箱内过夜培养。挑取平板上阳性菌落培养,使用 DNA 小量抽提试剂盒提取 DNA,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

2.3 重组 pPGN 蛋白的表达 将原核表达载体 pET-28a(+)-pPGN 转化至 *E. coli* BL21(DE3) 中,挑取单菌落接种到 5 mL 含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,于 37 ℃、250 r/min 摇床中过夜培养。将过夜培养的菌液按 1:50 的比例接种到含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中扩大培养约 2 h 至 A₆₀₀ 值达到 0.5 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,于 37 ℃、220 r/min 摇床中诱导 4 h,室温、4 000 r/min(离心半径 9 cm)离心 10 min,弃上清,沉淀加入 Binding Buffer(25 mmol/L Tris,500 mmol/L NaCl,pH8.0)重悬,重悬液经超声破碎后于 4 ℃、13 000 r/min 离心 30 min,取上清进行 SDS-PAGE 分析。

2.4 重组蛋白的纯化 取超声破碎后上清液,约每 20 mg 蛋白加入 1 mL 树脂。将上清液与预先由 Binding Buffer 缓冲液平衡的 Ni-NTA 填料在 4 ℃环境中混合孵育 2.5 h,装填到层析空柱中,经重力柱流穿后,使用 15 倍柱体积的 Wash Buffer(25 mmol/L Tris,500 mmol/L NaCl,20 mmol/L imidazole,pH 8.0)洗去杂蛋白,然后用 5 倍柱体积的 Elution Buffer(25 mmol/L Tris,500 mmol/L NaCl,500 mmol/L imidazole,pH8.0)洗脱目标蛋白。收集流出液和洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳分析。将含有目标蛋白洗脱液置于缓冲液 A(20 mmol/L 磷酸缓冲液,50 mmol/L NaCl,pH6.5)中 4 ℃过夜透析以除去盐和咪唑,将适量凝血酶添加到透析后的蛋白溶液中 4 ℃酶切 24 h,酶切蛋白使用超滤管浓缩至 5 mL 以下,使用分子筛对蛋白进行再纯化。

2.5 ITC 试验 取纯化的 pPGN 蛋白分别与 N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)、N-乙酰胞壁酸(NAM)进行相互作用试验。ITC 试验前设定温度 25 ℃,蛋白浓度 20 μ mol/L,NAG 浓度 200 μ mol/L,NAM 浓度 200 μ mol/L。滴定参数为首滴 2 μ L,持续时间 4 s,之后每滴 6 μ L,持续时间 12 s,每两滴之间间隔 150 s,功率参考值为 10 μ Cal/sec,搅拌器转速为 307 r/min。试验结束后用 ITC 自带软件对实验数据进行处理。

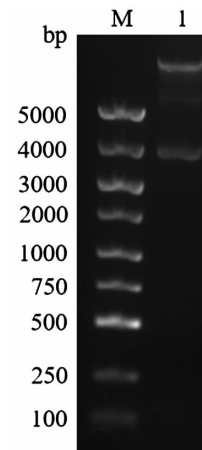
2.6 生物信息学分析 使用 ExPasy 网站的 Prot-

param 和 Proscale 工具对 pPGN 重组蛋白进行理化性质和亲水性分析;运用 TMHMM2.0 工具在线预测重组蛋白的跨膜区域;运用 NetPhos3.1 和 CD-Search 工具预测蛋白的磷酸化位点及保守区域分析;运用 SignalP-6.0 对蛋白质中存在的信号肽进行预测;运用 UniProt-AlphaFold 在线对蛋白质的三级结构进行预测并构建模型;使用 DALI 在线网站比对分析与 pPGN 蛋白结构相似度较高的两种蛋白,并用 Chime-
raX 软件对 pPGN 蛋白中的 SPOR 结构域与其他两种含有 SPOR 结构域的蛋白进行三级结构比较;使用 AutoDock 对 pPGN 蛋白中的 SPOR 结构域与肽聚糖三糖链(NAM-NAG-NAM)进行对接;使用 STRING 软件分析重组蛋白与其他蛋白之间的相互作用。

结果

1 重组表达载体的构建与鉴定

以大肠埃希菌为宿主菌优化 pPGN 蛋白编码序列,所得序列经合成后通过 Nde I 和 Xho I 酶切位点克隆到 pET-28a(+)载体中,得到重组表达载体 pET-28a(+)-pPGN。用 pET-28a(+)-pPGN 转化 DH5 α 感受态细胞,得到的阳性菌落取质粒后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见明显的质粒条带(图 2),表明 pET-28a(+)-pPGN 成功转化到 DH5 α 中。

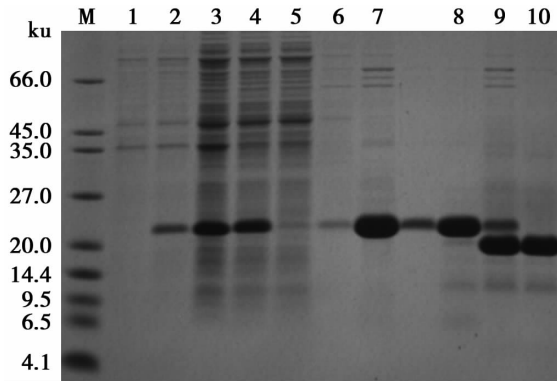


M DNA 标志物 1 重组菌质粒 DNA
图 2 重组菌质粒 DNA 1% 琼脂糖凝胶电泳分析
M DNA marker 1 Gene amplification products of interest
Fig. 2 Results of agarose gel electrophoresis

2 重组 pPGN 蛋白的表达检测及纯化

pET-28a(+)-pPGN 转化至 DE3 后用终浓度 1 mmol/L IPTG 于 37 ℃诱导 4 h,收集重组菌,超声破碎后进行 15% SDS-PAGE 电泳分析,表达蛋白的分子质量约为 20 ku,与预测的蛋白分子质量一致。该蛋白主要存在于重组菌超声破碎上清液中。取重组菌超声破碎上清进行 Ni-NTA 亲和层析纯化,大部分杂蛋白被去除,但还存在部分浓度较低的杂蛋白。目的

蛋白经酶切后使用分子筛进一步纯化,酶切后的 pPGN 蛋白约 17 ku,与理论分子质量(16.4 ku)一致(图 3)。分子筛纯化得到单一电泳条带的 pPGN 蛋白溶液,且浓度较高,出峰位置位于 70 mL 附近(图 4)。说明该蛋白以单体形式存在于溶液中。



M 蛋白分子质量标准 1 重组菌未诱导对照 2 重组菌 IPTG 诱导 4 h 3 IPTG 诱导重组菌超声破碎全菌液 4 IPTG 诱导重组菌超声破碎上清 5 亲和层析 Binding Buffer 流穿液 6 亲和层析 Wash Buffer 流穿液 7 Elution Buffer 流穿液 8 亲和层析纯化蛋白未酶切 9 亲和层析纯化蛋白酶切 4 h 10 分子筛纯化的酶切蛋白离心后上清

图 3 SDS-PAGE 检测 pPGN 蛋白的表达及纯化

M Pprotein marker 1 Induction of prebacteria 2 Post-induction bacteria 3 Bacteria after crushing 4 Bacterial supernatant after disruption 5 Binding Buffer flow through liquid 6 Wash Buffer flow through fluid 7 Elution Buffer flow through fluid 8 Pre-digestion protein solution 9 Protein solution after digestion Supernatant the protein solution after centrifugation

Fig. 3 SDS-PAGE detected the expression of pPGN protein and affinity chromatographic purification

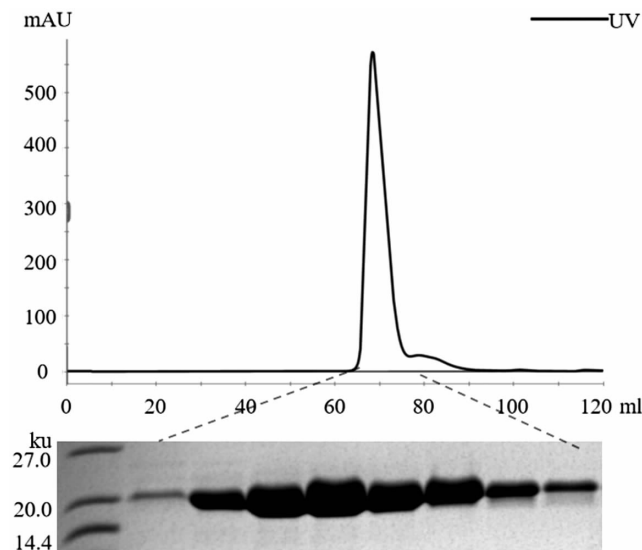


图 4 pPGN 蛋白的分子筛纯化

Fig. 4 Molecular sieve purification of pPGN protein

3 ITC 试验结果分析

ITC 图谱显示,滴定过程中信号峰位于 0 附近,未出现热量变化,说明 pPGN 蛋白不与 NAM、NAG 结合(图 5)。由于难以合成多糖的聚糖链,所以未进行

pPGN 与多糖的结合试验。

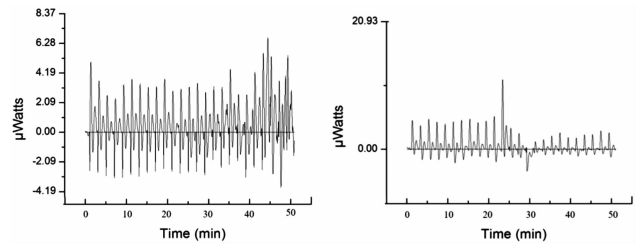


图 5 pPGN 蛋白与 NAM(左)及 NAG(右)的 ITC 图
Fig. 5 ITC results of pPGN protein and NAM (left) and NAG (right)

4 pPGN 蛋白的生物信息学分析

4.1 蛋白的基本特征 ExPasy 网站 Protparam 和 Proscale 分析显示, pPGN 蛋白的理论分子质量为 16.400 63 ku,等电点为 9.41,理论上为碱性蛋白;分子式为 $C_{727}H_{1154}N_{212}O_{215}S_3$,吸光度为 1.062,不稳定性指数为 38.07,属于稳定性蛋白;脂肪系数为 83.63,总平均亲水性为 -0.429(图 6)。TMHMM2.0 在线分析 pPGN 蛋白无跨膜区域,且预测氨基酸位于膜细胞质侧的总概率为 0.397 18,推测为膜外蛋白。

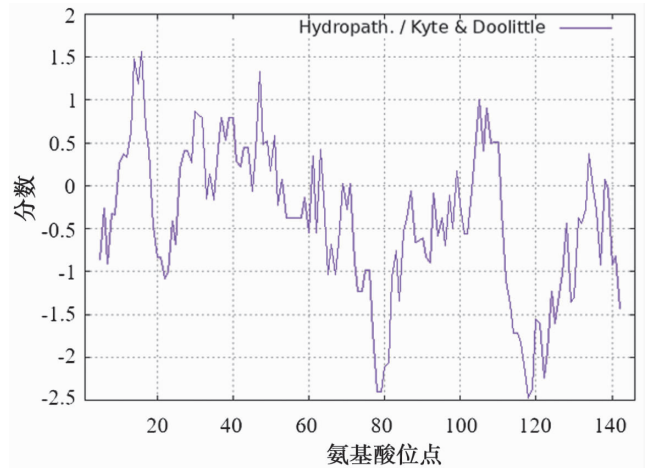


图 6 pPGN 蛋白亲水性分析
Fig. 6 Analysis of hydrophilicity of pPGN protein

4.2 蛋白磷酸化位点及保守区域分析 NetPhos3.1 分析 pPGN 蛋白有 24 个磷酸化位点,其中包含 13 个丝氨酸位点,4 个苏氨酸位点和 7 个酪氨酸位点(图 7)。CD-Search 工具预测 pPGN 蛋白中包含一个 SPOR 结构域(图 8)。

4.3 蛋白的三级结构 使用 UniProt-AlphaFold 在线预测 PGN 蛋白的三级结构,结果如图 9。其中深蓝色表示模型置信度非常高($pLDDT > 90$);浅蓝色表示置信度较高($70 < pLDDT < 90$);黄色表示置信度较低($50 < pLDDT < 70$);橙色表示置信度非常低($pLDDT < 50$)。SignalP-6.0 分析蛋白的前 22 个氨基酸中存在信号肽,且该段序列属于非结构化区域,所以 pPGN

是从第 23 位氨基酸位置开始合成的(总长 146 个氨基酸)。

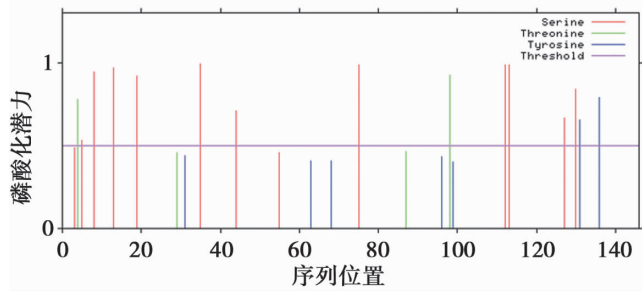


图 7 pPGN 蛋白磷酸化位点预测
Fig. 7 Phosphorylation site prediction of pPGN protein

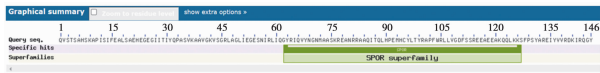


图 8 pPGN 蛋白保守区域预测
Fig. 8 Prediction of pPGN protein conserved regions

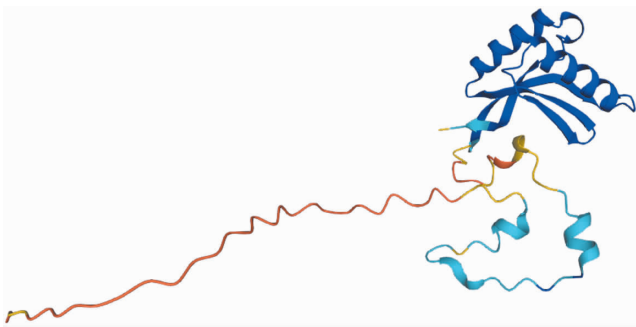
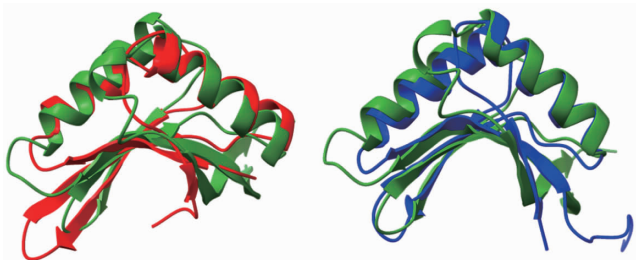


图 9 PGN 蛋白的三级结构模拟图
Fig. 9 Tertiary structure simulation of PGN protein

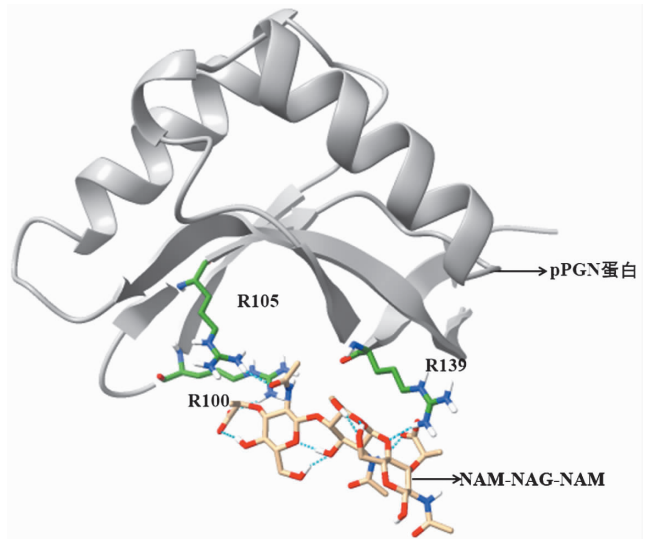
4.4 三级结构比对分析 使用 DALI 进行比对分析, pPGN 蛋白的 SPOR 结构域与 RlpA(6i09-A)和 CwIC (1x60-A)两种蛋白相似度较高,其中与 RlpA 的 Z 值为 6.4,RMSD 为 1.9;与 CwIC 的 Z 值为 6.6,RMSD 为 3.0。ChimeraX 软件分析如图 10,pPGN 蛋白中的 SPOR 结构域与其他两种蛋白的相似度极高。



注:绿色为 pPGN 蛋白,红色为 RlpA 蛋白,蓝色为 CwIC 蛋白。
图 10 pPGN 与 RlpA 和 CwIC 蛋白的三级结构对比图
Notes:Green is pPGN protein, red is RlpA protein, and blue is CwIC protein.

图 10 Tertiary structure comparison of pPGN protein with RlpA protein and CwIC protein

4.5 分子对接分析 SPOR 结构域蛋白与肽聚糖链多糖之间存在相互作用,而 pPGN 蛋白是否存在类似相互作用以及作用残基尚不清楚。本研究使用 AutoDock 对 pPGN 蛋白与三糖(NAM-NAG-NAM)进行对接,结果如图 11。pPGN 蛋白与 NAM-NAG-NAM 结合作用的几个关键残基为 R100、R105、R139,全部来自 β -折叠。其中,R100 与 R105 结合于同一 NAM 上的不同氧原子,而 R139 则与另一侧 NAM 相作用,但是它们之间都是通过氢键相互作用的。而 pPGN 蛋白与 NAM-NAG-NAM 的结合发生在两端的 NAM,也解释了 pPGN 蛋白不与单糖结合的原因。



注:灰色代表 pPGN 蛋白中的 SPOR 结构域,绿色棒状代表相互作用的残基,红色代表氧原子,白色代表氢原子,蓝色代表氮原子,虚线代表氢键。

图 11 pPGN 蛋白与 NAM-NAG-NAM 的分子对接结果图
Notes:Gray represents the SPOR domain in the pPGN protein, green rods represent interacting residues, red represents oxygen atoms, white represents hydrogen atoms, blue represents nitrogen atoms, and dashed lines represent hydrogen bonds.

图 11 Molecular docking results of pPGN protein and NAM-NAG-NAM

4.6 相互作用蛋白预测 STRING 分析共有 10 种蛋白与 pPGN(PGN_0666)存在相互作用关系,其中 PGN_1354、PGN_0663、PGN_0664、PGN_1595、PGN_0674、PGN_1735、PGN_0156、PGN_0876 来自牙龈卟啉单胞菌,与 pPGN(PGN_0666)存在共生关系;tpiA 是磷酸三糖异构酶,参与糖异生;foIE 为 GTP 环水解酶 I(图 12)。

讨论

牙龈卟啉单胞菌是牙周病的主要病原菌之一,可通过其菌体表面的菌毛和荚膜等定植在牙周组织上,侵入宿主组织细胞^[10]。临床试验证实牙龈卟啉单胞菌体分泌的脂多糖和牙龈蛋白酶直接破坏牙周组织,

引起牙周组织局部免疫反应,促使大量炎症介质释放,导致牙周炎^[11]。此外,牙龈卟啉单胞菌通过肽基氨基酸脱亚胺酶加剧溃疡性结肠炎的严重程度^[12],牙龈卟啉单胞菌中的毒力因子还会引发阿尔茨海默症(AD)、类风湿性关节炎、心血管疾病等^[13-16]。研究表明,抗牙龈卟啉单胞菌感染治疗的新型药物从减少毒力、抑制生物膜的形成、以及人工合成抗菌肽等方面获得了良好的体外抗菌效果,但是安全性、有效性还未在临床上得到验证^[2,11,17]。因此,对于牙龈卟啉单胞菌的研究将会为临床上很多疾病的治疗提供一条新思路,同时有助于牙周炎及其他疾病的预防,也为新药的研发提供靶点。

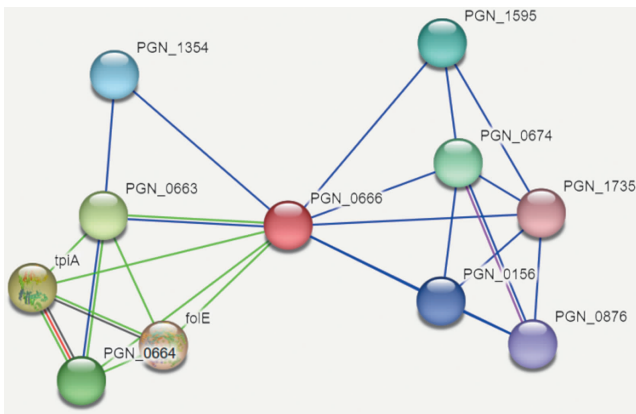


图 12 pPGN 蛋白相互作用蛋白分析
Fig. 12 Analysis of pPGN protein interacting proteins

SPOR 结构域广泛存在于细菌蛋白质中。SPOR 结构域被认为具有两种功能,其一与细胞分裂相关,其二与肽聚糖结合^[3,9]。据报道,来自枯草芽孢杆菌的细胞壁酰胺酶含有 SPOR 结构域,它通过降解母细胞肽聚糖而影响细胞分裂^[18]。来自牙龈卟啉单胞菌的 pPGN 蛋白可通过影响细胞的分裂过程抑制牙龈卟啉单胞菌的生长。Alcorlo 等^[19]研究发现铜绿假单胞菌中的 SPOR 结构域蛋白与不含肽茎的肽聚糖链结合。Yahashiri 等^[7]证实 SPOR 结构域的主要功能是将蛋白质靶向分裂位点,并且来自不同菌株的蛋白与肽聚糖结合的亲和力不同。Pazos 等^[20]报道 SPOR 结构域蛋白通过影响 PBP1A 和 PBP1B 活性来影响细胞的分裂过程。以上研究结果表明 SPOR 结构域在细胞分裂过程中发挥重要作用,又因其只存在于细菌中,故可作为潜在的抗菌药物靶点。pPGN 作为含有 SPOR 结构域的蛋白之一,推测也会与肽聚糖相互作用并影响细胞的分裂过程,对其结构与功能的研究有助于牙龈卟啉单胞菌诱发疾病的新药研发。

本研究构建了牙龈卟啉单胞菌的 pPGN 蛋白的重组质粒 pET-28a(+)-pPGN,对重组蛋白进行了异源表达,确定其最佳诱导表达条件为 37 °C, 220 r/

min, IPTG 终浓度为 1 mmol/L, 诱导时间 4 h。经 SDS-PAGE 电泳分析, pPGN 蛋白主要存在于重组菌超声破碎上清中。经亲和层析纯化, 获得含有小部分杂蛋白的目标蛋白, 酶切去除 6×His 标签后的分子质量约为 17 ku, 与目标蛋白理论值 16.4 ku 一致。酶切蛋白经分子筛纯化, 得到纯度较高的终浓度 13.204 mg/mL 的 pPGN 蛋白。用该蛋白与肽聚糖链单体做 ITC 试验, 结果并不理想。有报道含有 SPOR 结构域的 RlpA 蛋白可与去除肽茎的四糖相互作用^[19]。由于多糖难以合成, 所以暂未验证 pPGN 蛋白与多糖之间的结合作用。

对 pPGN 蛋白进行生物信息学分析, 其等电点为 9.41, 为碱性蛋白。该蛋白含有磷酸化位点, 其 C 末端含有一个 SPOR 结构域。三级结构预测及比对分析显示, pPGN 蛋白的三级结构与另两种含有 SPOR 结构域的 RlpA 和 CwlC 蛋白的三级结构高度相似, 推测 pPGN 中也存在与肽聚糖链相互作用的区域。对 pPGN 蛋白和 NAM-NAG-NAM 进行分析对接, 显示 pPGN 蛋白与 NAM-NAG-NAM 相互作用的残基分别为 R100、R105、R139, 全部来自 β-折叠; 而残基与 NAM-NAG-NAM 的结合发生在两端的 NAM, 这也可能是 pPGN 蛋白与单糖不结合的原因之一。

综上所述, 本研究成功表达了来自牙龈卟啉单胞菌的 pPGN 蛋白, 经亲和层析和分子筛纯化获得高纯度高浓度的目标蛋白。蛋白功能及生物信息学分析显示, pPGN 为碱性稳定性蛋白, 含有磷酸化位点和 SPOR 结构域, 且含有与 NAM-NAG-NAM 相结合的作用位点残基, 为该蛋白的结构和功能研究奠定了基础, 对于牙龈卟啉单胞菌诱发的牙周炎及引起的其他疾病的治疗提供了一条新思路。

【参考文献】

- [1] 夏浩源, 林琳, 陈素云. 牙龈卟啉单胞菌感染治疗研究进展[J]. 临床口腔医学杂志, 2022, 38(10): 633-636.
- [2] 梁梦歌, 李智涛, 郑月月, 等. 牙龈卟啉单胞菌疫苗的研究进展[J]. 食管疾病, 2022, 4(3): 172-176.
- [3] 吴沁蕊, 彭显. 牙龈卟啉单胞菌促进心血管疾病的研究进展[J]. 口腔医学研究, 2022, 38(2): 108-112.
- [4] Yahashiri A, Jorgenson MA, Weiss DS. The SPOR domain, a widely conserved peptidoglycan binding domain that targets proteins to the site of cell division[J]. J Bacteriol, 2017, 199(14): e00118-17.
- [5] Allain FH, Howe PW, neuhaus D, et al. Structural basis of the RNA-binding specificity of human U1A protein[J]. EMBO J, 1997, 16(18): 64-72.
- [6] Nagai K, Oubridge C, Jessen TH, et al. Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A [J]. Nature, 1990, 348(6301): 515-520.

(下转 1038 页)

- [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(5):6.
- [11] Krzyek P, Grande R. Transformation of *Helicobacter pylori* into coccoid forms as a challenge for research determining activity of antimicrobial substances[J]. Pathogens, 2020, 9(3):184.
- [12] 曾浩, 郭刚, 毛旭虎, 等. 幽门螺杆菌适应性球形变异相关蛋白的筛选及鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(4):251-254, 封4.
- [13] Chaput C, Ecobichon C, Cayet N, et al. Role of AmiA in the morphological transition of *Helicobacter pylori* and in immune escape[J]. PLoS Pathogens, 2006, 2(9):e97.
- [14] Figura N, Moretti E, Vaglio L, et al. Factors modulating the outcome of treatment for the eradication of *Helicobacter pylori* infection[J]. New Microbiol, 2012, 35(3):335-340.
- [15] Krogfelt KA, Poulsen LK, Molin S. Identification of coccoid *Escherichia coli* BJ4 cells in the large intestine of streptomycin-treated mice[J]. Infect Immun, 1993, 61(12):5029-5034.
- [16] Chaiyanan S, Grim C, Maugel T, et al. Ultrastructure of coccoid viable but non-culturable *Vibrio cholerae* [J]. Environ Microbiol, 2007, 9(2):393-402.
- [17] Ghaffar NM, Connerton PL, Connerton IF. Filamentation of campylobacter in broth cultures[J]. Front Microbiol, 2015, 6:657.
- [18] Salama N R. Cell morphology as a virulence determinant; lessons from *Helicobacter pylori* [J]. Curr Opin Microbiol, 2020, 54:11-17.
- [19] Krzyek P, Biernat M M, Gociniak G. Intensive formation of coccoid forms as a feature strongly associated with highly pathogenic *Helicobacter pylori* strains [J]. Folia Microbiol (Praha), 2019, 64(3):273-281.
- [20] Guo BP, Mekalanos JJ. Rapid genetic analysis of *Helicobacter pylori* gastric mucosal colonization in suckling mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(12):8354-9.
- [21] van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* vacA [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(9):2597-603.
- [22] Blaser MJ, Berg DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease [J]. J Clin Invest, 2001, 107(7):767-773.
- [23] Salama, Nina, Guillemin, et al. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(26):14668-14673.
- [24] 刘炯, 许国铭, 李兆申, 等. *cag* 致病岛在中国人感染幽门螺杆菌中的结构特征及分类价值 [J]. 中华消化杂志, 2001, 21(8):469-472.
- [25] Yamaoka Y, Saribasak H, Salih B A, et al. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(4):1648-1651.
- [26] Gu H. Role of Flagella in the Pathogenesis of *Helicobacter pylori* [J]. Curr Microbiol, 2017, 74(7):863-869.

【收稿日期】 2023-03-29 【修回日期】 2023-06-13

(上接 1033 页)

- [7] Yahashiri A, Kaus GM, Popham DL, et al. Comparative study of bacterial SPOR domains identifies functionally important differences in glycan binding affinity [J]. J Bacteriol, 2022, 204(9):e00252-22.
- [8] Gerding MA, Liu B, Hale CA, et al. Self-enhanced accumulation of FtsN at division sites and roles for other proteins with a SPOR domain (DamX, DedD, and RlpA) in *Escherichia coli* cell constriction [J]. J Bacteriol, 2009, 191(24):7383-7401.
- [9] Arends SJR, Williams K, Scott RJ, et al. Discovery and characterization of three new *Escherichia coli* septal ring proteins that contain a SPOR domain; DamX, DedD, and RlpA [J]. J Bacteriol, 2010, 192(1):242-255.
- [10] Sharaf S, Hijazi K. Modulatory mechanisms of pathogenicity in *Porphyromonas gingivalis* and other periodontal pathobionts [J]. Microorganisms, 2022, 11(1):15.
- [11] 刘珊. 抗牙龈卟啉单胞菌感染治疗的新型药物研究 [J]. 中国处方药, 2022, 20(4):191-192.
- [12] Zhao XD, Liu JB, Zhang C, et al. *Porphyromonas gingivalis* exacerbates ulcerative colitis via *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase [J]. Internat J Oral Sci, 2021, 13(3):311-322.
- [13] Liu S, Butler CA, Ayton S, et al. *Porphyromonas gingivalis* and the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Crit Rev Microbiol, 2023, 1(4):1-11.
- [14] Lunar SI, Cascales E. Molecular Strategies Underlying *Porphyromonas gingivalis* Virulence [J]. Mol Biol, 2021, 433(7):166836.
- [15] Perricone C, Ceccarelli F, Saccucci M, et al. *Porphyromonas gingivalis* and rheumatoid arthritis [J]. Curr Opin Rheumatol, 2019, 31(5):517-524.
- [16] Xie MR, Tang QM, Nie JM, et al. BMAL1-downregulation aggravates *Porphyromonas Gingivalis*-Induced atherosclerosis by encouraging oxidative stress [J]. Circulation Res, 2020, 126(6):15-29.
- [17] 姚佳倩, 吴月波, 胡婷婷, 等. 赤藓糖醇喷砂辅助治疗慢性牙周炎临床效果及对牙龈卟啉单胞菌的影响 [J]. 实用口腔医学杂志, 2022, 38(5):623-627.
- [18] Smith TJ, Foster SJ. Characterization of the involvement of two compensatory autolysins in mother cell lysis during sporulation of *Bacillus subtilis* 168 [J]. J Bacteriol, 1995, 177:3855-3862.
- [19] Alcorlo M, Dik David A, De Benedetti S, et al. Structural basis of denuded glycan recognition by SPOR domains in bacterial cell division [J]. Nat Communicat, 2019, 10(1):55-67.
- [20] Pazos M, Peters K, Boes A, et al. SPOR proteins are required for functionality of class A penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* [J]. mBio, 2020, 11(6):e02796-20.

【收稿日期】 2023-04-23 【修回日期】 2023-07-08