

梅毒螺旋体金属蛋白酶水解纤维蛋白原的活性研究

刘双全

(南华大学附属第一医院检验科,湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 研究梅毒螺旋体金属蛋白酶 Tp0751 对细胞外基质纤维蛋白原的水解能力,为深入研究 TP 的致病机制提供实验依据。**方法** 采用两点法构建 H198A 突变型及 H202A 突变型 Tp0751 基因,分别构建野生型和突变型 Tp0751 原核载体进行诱导表达;体外实验检测 Tp0751 野生型 Tp0751 蛋白、H198A Tp0751 突变型蛋白、H202ATp0751 突变型蛋白对纤维蛋白原的降解活性。**结果** 成功表达并纯化了野生型 Tp0751 蛋白、H198A Tp0751 突变体蛋白、H202A Tp0751 突变体蛋白,各蛋白相对分子质量大小约为 26kD;纤维蛋白原在与野生型 Tp0751 蛋白作用约 24h 后被完全水解;与 H198A Tp0751 突变体蛋白作用约 24 h 后部分水解,尚有部分未被降解;与 H202A Tp0751 突变体蛋白作用约 24h 后几乎不被水解。**结论** 野生型 Tp0751 蛋白具有水解纤维蛋白原的作用;Tp0751 蛋白水解纤维蛋白原的活性可能与金属蛋白酶 HEXXH 域相关,影响 Tp0751 蛋白对纤维蛋白原的降解的活性位点可能是 202 位的 H 而不是 198 位的 H。

关键词: 梅毒螺旋体; 金属蛋白酶; Tp0751; 水解活性

中图分类号:R377.1 **文献标识码:**A

The Fibrinolytic Potential of Treponema Pallidum Metalloprotease

LIU Shuangquan

(The First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the fibrinolytic potential of Treponema pallidum metalloprotease Tp0751, providing the experimental basis for further research on syphilis pathogenic mechanism. **Methods** Constructed the H198A mutant Tp0751 and H202A mutant Tp0751 with two-point technology. Wide-type and Mutant Tp0751 recombinant protein were expressed in E. coli BL21. And detected their degradation activity to fibrinogen. **Results** Three fusion protein with molecular weight about 26KDa were attained after expression and purification, The wild type Tp0751 can degradate plasminogen-free human fibrinogen, fibrinogen was absolutely degraded 24h post-incubation, The H198A mutant Tp0751 can also degradate plasminogen-free human fibrinogen, but which was partly degraded 24h post-incubation; The H202A mutant Tp0751 can not degradate plasminogen-free human fibrinogen, fibrinogen was scarcely degraded 24h post-incubation. **Conclusion** The wild type Tp0751 can degradate plasminogen-free human fibrinogen, The HEXXH motif may have a important role on Tp0751 to the degradation of plasminogen-free human fibrinogen, residue H202, but not H198, from the palli-lysin HEXXH motif is required for fibrinogen degradation.

Key words: Treponema pallidum; metalloprotease; Tp0751; fibrinolytic potential; Pathogenic mechanism

梅毒螺旋体(Treponema pallidum, Tp)是引起人类梅毒(syphilis)的病原体。梅毒是一种能造成成人严重全身性损害及胎儿的胎传梅毒的性传播性疾病(STD)^[1-4]。居高不下的梅毒发病率引起了我国

公共卫生部门乃至全球公共卫生部门的高度关注,控制本病的关键环节则是阐明 Tp 致病机制。感染宿主过程中,黏附是 Tp 感染机体的第一步, Tp 穿透血管壁屏障后,如何防止血液凝固是 Tp 随血液循环播散至全身引起慢性感染的关键。血液凝固的关键过程是血浆中的纤维蛋白原转变为不溶的纤维蛋白。Houston^[5]等发现 Tp0751 除了能结合宿主 ECM 外,还能降解人类纤维蛋白原。HEXXH 活性区为

收稿日期:2015-04-10;修回日期:2015-06-30

基金项目:国家自然科学基金(No. 81201331);湖南省自然科学基金重点项目(No. 11JJ4076);湖南省教育厅青年基金(No. 11B107)。

金属蛋白酶活性域,其与细菌许多蛋白降解活性相关^[6-9]。但是,Tp0751 金属蛋白酶的水解活性是否与该区域有关尚有待研究和探索。为了探索 Tp0751 蛋白水解活性机制,本文对野生型及 HEXXH 活性区突变型 Tp0751 蛋白水解纤维蛋白原的活性进行研究,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

1.1.1 菌株与载体 Tp Nichols 标准株、表达宿主菌 E. coli BL21 (DE3)、PET-30a (+) 质粒均为南华大学病原生物学研究所保存。

1.1.2 主要试剂 蛋白分子量标准,Ni-NTA 亲和层析柱购自 QIAGEN 公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究所;卡那霉素购自上海生工生物工程公司;人纤维蛋白原购自美国 Sigma 公司。

1.1.3 主要仪器 HEMA 公司凝胶图像分析系统;北京六一仪器厂水平电泳仪;MP220 超声细胞破碎仪;Beckman 公司 DU640 核酸蛋白定量分析仪。

1.2 方法

1.2.1 野生型和突变型 Tp0751 重组表达载体的构建 野生型 Tp0751 重组质粒的构建:从 GenBank 中查询 Tp0751 基因序列,设计 1 对 PCR 扩增引物,由上海生工合成;以 Tp Nichols 株的基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 Tp0751 基因,构建 pET30a (+) / Tp0751 重组表达质粒(上述质粒构建由本课题组前期研究完成)

H198A 和 H202A 突变型 Tp0751 重组质粒的构建:从 GenBank 中查询 Tp0751 基因序列,针对 Tp0751 金属结构域 HEXXH 中的 198 位的 H 及 202 位的 H,采用两点法分别设计 2 对 PCR 扩增引物,构建 pET30a (+) / H198A Tp0751、pET30a (+) / H202A Tp0751 重组表达质粒(上述质粒由北京博亚结晶生物科技公司构建)。

1.2.2 野生型和突变型 Tp0751 重组蛋白的表达、纯化 将 pET30a (+) / Tp0751、pET30a (+) / H198A Tp0751 和 pET30a (+) / H202A Tp0751 重组表达质粒转入表达菌 E. coli BL21 构建原核重组表达体,分别挑选单个阳性菌落,大量诱导表达重组蛋白;离心收集菌体,用超声波破碎菌体后离心收集上清上 Ni-NTA 亲和层析柱纯化,具体操作见说明书,SDS-PAGE 电泳分析蛋白纯化产物。

1.2.3 野生型 Tp0751 蛋白、H198A 突变型和 H202A 突变型 Tp0751 对 Fg 水解能力检测 将野生型 Tp0751 蛋白、H198A 和 H202A 突变型 Tp0751 蛋白与 Fg 按比例混合(蛋白终质量为 30 μg,Fg 中终质量为 60 μg,反应总体积为 100 μL),SDS-PAGE 检测 Tp0751 对 Fg 不同作用时间段的降解活性。

2 结 果

2.1 野生型、H198A 突变型和 H202A 突变型 Tp0751 重组蛋白的表达、纯化 挑选阳性重组表达菌进行 IPTG 诱导表达;SDS-PAGE 分析发现在分子量约为 26 KD 处有一明显蛋白条带,与预期的分子量大小相符(图 1);重组蛋白经纯化后,蛋白纯度在 90% 以上。

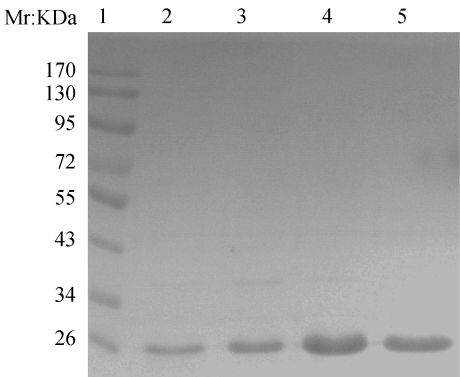


图 1 野生型 Tp0751 重组蛋白纯化结果图 1:蛋白 Mark;2:洗涤液洗涤第一次;3:洗涤液洗涤第二次;4:洗脱液洗脱第一次;5:洗脱液洗脱第二次

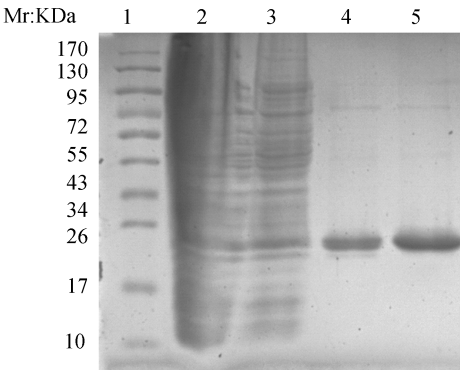


图 2 H198A 突变型 Tp0751 蛋白纯化结果图 1:蛋白 Mark;2:洗涤液洗涤第一次;3:洗涤液洗涤第二次;4:洗脱液洗脱第一次;5:洗脱液洗脱第二次

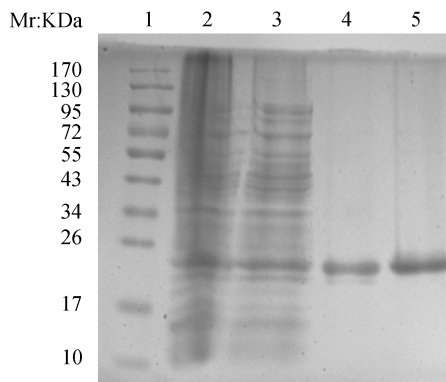


图3 H202A 突变型 Tp0751 蛋白纯化结果图 1:蛋白 Mark; 2:洗涤液洗涤第一次;3:洗涤液洗涤第二次;4:洗脱液洗脱第一次; 5:洗脱液洗脱第二次

2.2 野生型 Tp0751 水解纤维蛋白原的活性 野生型 Tp0751 蛋白水解纤维蛋白原反应总体积为 100 μ L,包括 30 μ g 野生型 Tp0751 蛋白,60 μ g Fg,反应 0 h,1 h,2 h,4 h,6 h,8 h,12 h,24 h 后,分别留取反应产物,与 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液混匀后,100 $^{\circ}$ C,5 min,跑 SDS-PAGE 蛋白胶分析,结果如图 4 所示:Fg 在与 Wt-Tp0751 反应 6 h 后开始出现明显降解,在反应 12 h 后 Fg 基本上被完全降解,且 Wt-Tp0751 目的蛋白逐渐减少并出现了多条小分子降解蛋白条带。

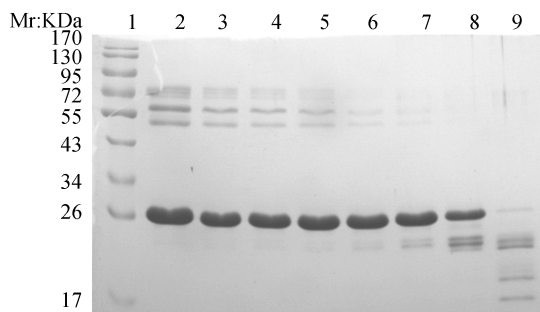


图4 wt-Tp0751 蛋白水解 Fg 结果图 1:蛋白 Mark;2:反应 0 h后;3:反应 1 h后;4:反应 2 h后;5:反应 4 h后;6:反应 6 h后;7:反应 8 h后;8:反应 12 h后;9:反应 24 h后

2.3 H198A 突变型 Tp0751 水解纤维蛋白原的活性 水解结果如图 5 所示:Fg 在与 H198A 突变型 Tp0751 6 h 后逐渐开始出现降解,但是反应 24 h 后,尚存明显的未被降解的蛋白带。

2.4 H202A 突变型 Tp0751 水解纤维蛋白原的活性 水解结果如图 6 所示:Fg 在与 H202A 突变型 Tp0751 蛋白作用 24 h 后,Fg 基本上未被降解,突变型 Tp0751 蛋白也未见明显降解。

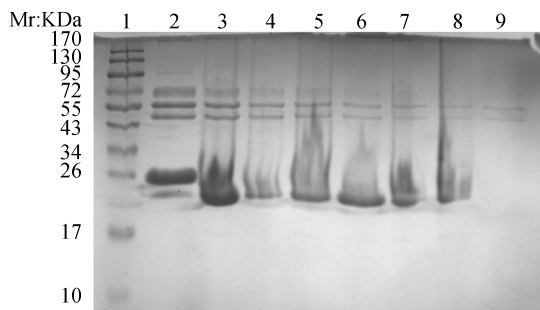


图5 H198A 突变型 Tp0751 蛋白水解 Fg 结果图 1:蛋白 Mark;2:反应 0 h后;3:反应 1 h后;4:反应 2 h后;5:反应 4 h后;6:反应 6 h后;7:反应 8 h后;8:反应 12 h后;9:反应 24 h后

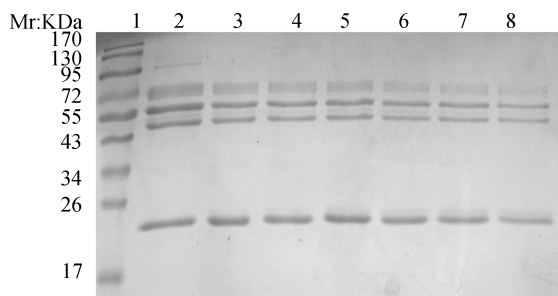


图6 H202A 突变型 Tp0751 蛋白水解 Fg 结果图 1:蛋白 Mark;2:反应 0 h后;3:反应 1 h后;4:反应 2 h后;5:反应 4 h后;6:反应 6 h后;7:反应 8 h后;8:反应 24 h后

3 讨 论

Tp 本身的代谢能力低下无法进行体外的连续人工培养、缺乏遗传可操作系统和外膜易脆性导致人们对 Tp 不能进行遗传操作,严重阻碍了人们从分子水平对 Tp 致病机制的研究^[10]。Tp 全基因序列解析^[2]极大的促进了人们对 Tp 基因结构与功能的研究。Tp 在感染宿主过程中,粘附是 Tp 感染机体的第一步,也是 Tp 在体内定植和扩散的关键因素。Tp 除了能黏附于许多宿主细胞上^[4,10-14],还能结合细胞外基质;介导 Tp 与宿主细胞黏附的主要介质之一便是细胞外基质;导致梅毒广泛传播的主要原因则是 Tp 与各种细胞外基质的结合。目前已证实 Tp0483^[12]、Tp0136^[15]、Tp0751^[11,14]能吸附宿主细胞外基质,如纤连蛋白、层粘连蛋白等,这些蛋白被认为是 Tp 的粘附素,其中最为重要、研究最多的是粘附素 Tp0751。

最新研究表明 Tp0751 是具有双重生物学功能的膜相关酶,不但参与粘附,还是一种依赖锌的具有金属酶样活性的能水解组织成分的蛋白,其与 Tp 感染

后扩散密切相关^[5]。HEXXH 活性区为金属蛋白酶金属离子依赖的活性区,其与细菌许多蛋白降解活性相关。Tp0751 金属蛋白酶的水解活性是否与该区域有关尚有待研究和探索。本研究拟通过构建和表达野生和突变型 Tp0751 蛋白,分别对其水解 Fg 的活性进行研究,进行其金属酶水解活性区的探索,为深入研究 Tp 致病机制奠定基础 and 提供实验依据。

本研究通过体外研究野生型 Tp0751 蛋白及其突变体蛋白对人纤维蛋白原 Fg 的水解情况,从蛋白结构方面入手进而研究其水解细胞外基质成分的能力;本研究选择了金属蛋白酶结构域 HEXXH 中 198 位的 H 及 202 位的 H 作为突变位点, Tp 的天然宿主人类的细胞外基质成分纤维蛋白原作为基质,通过定时吸取目的蛋白与纤维蛋白原反应物进行 SDS-PAGE 分析显示 Fg 水解程度的判断,从而确定目的蛋白的水解能力。

研究结果显示:蛋白与纤维蛋白原反应 24 小时后,与 wt-Tp0751 蛋白作用的纤维蛋白原能被完全降解;而与 H198A 突变体蛋白作用的纤维蛋白原还有明显的未被降解的蛋白带存在;与 H202A 突变体蛋白作用的纤维蛋白原则基本上未被降解。同 wt-Tp0751 相比, H198A 突变体蛋白水解 Fg 的活性明显减弱,但仍存在一定的水解能力, H202A 突变体蛋白几乎不存在水解 Fg 的能力。结果提示 Tp 金属蛋白酶 HEXXH 结构域中, 202 位 H 可能与 Tp0751 降解细胞外成分的活性有关,而 108 位的 H 可能与之降解活性无关,但是至于该结构域其它位点是否也与蛋白水解活性有关,各位点间对 Fg 的水解是否存在协同作用亦或是抑制作用我们尚不得而知。为了进一步探索其水解活性功能域,有必要对 HEXXH 结构域其它位点突变体蛋白对蛋白水解 Fg 能力进行研究。

参考文献:

- [1] Zhao F, Zhang X, Liu S, et al. Assessment of the immune responses to *Treponema pallidum* Gpd DNA vaccine adjuvanted with IL-2 and chitosan nanoparticles before and after *Treponema pallidum* challenge in rabbits[J]. *Sci China Life Sci*, 2013, 56(2): 174-180.
- [2] Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete[J]. *Science*, 1998, 281: 375-378.
- [3] Peeling RW, Cook EW. The pathogenesis of syphilis: the

- Great Mimicker, revisited. [J] *J Pathol*, 2006, 208(2): 224-232.
- [4] Lafond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19(1): 29-49.
- [5] Houston S, Hof R, Francescutti T, et al. Bifunctional role of the *Treponema pallidum* extracellular matrix binding adhesin tp0751 [J]. *Infect Immun*, 2011, 79(3): 1386-1398.
- [6] Ghosh A, Saha DR, Hoque KM, et al. Enterotoxigenicity of mature 45-kilodalton and processed 35-kilodalton forms of hemagglutinin protease purified from a cholera toxin gene-negative *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain. *Infect [J]*. *Immun*, 2006, 74(5): 2937-2946.
- [7] Matsumoto K. Role of bacterial proteases in pseudomonal and seratial keratitis. *Biol Chem*, 2004, 385(11): 1007-1016.
- [8] Alan PB, Min C, He LM. The metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is activated by intramolecular autocatalysis [J]. *Bacteriol*, 2008, 190(1): 107-111.
- [9] Houston S, Hof R, Honeyman L. Activation and proteolytic activity of the *Treponema pallidum* metalloprotease, pallilysin [J]. *Plos Pathog*, 2012, 8(7): e1002822.
- [10] Lafond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19(1): 29-49.
- [11] Cameron CE, Brouwer NL, Tisch LM, et al. Defining the interaction of the *Treponema pallidum* adhesin Tp0751 with laminin [J]. *Infect Immun*, 2005, 73(11): 7485-7494.
- [12] Cameron CE, Brown EL, Kuroiwa JM, et al. *Treponema pallidum* fibronectin-binding proteins [J]. *Bacteriol*, 2004, 186(20): 7019-7022.
- [13] Liu S, Wang S, Wu Y, et al. Production of proinflammatory cytokines in the human THP-1 monocyte cell line following induction by Tp0751, a recombinant protein of *Treponema pallidum* [J]. *Sci China Life Sci*, 2010, 53(2): 229-233.
- [14] Cameron CE. Identification of a *Treponema pallidum* laminin-binding protein [J]. *Infect Immun*, 2003, 71(5): 2525-2533.
- [15] Brinkman MB, McGill MA, Pettersson J. A novel *Treponema pallidum* antigen, TP0136, is an outer membrane protein that binds human fibronectin [J]. *Infect Immun*, 2008, 76(5): 1848-1857.

(此文编辑:秦旭平)