

牙龈卟啉菌牙龈蛋白酶 K 的基因克隆和序列分析

张凤秋* 杨连甲 吴织芬 杨聚才

(第四军医大学口腔医学院 西安 710032)

摘要: 利用 PCR 方法, 分别扩增牙龈卟啉菌牙龈蛋白酶 K (*KGP*) 的催化结构域 (*KGPcd*) 和凝集素结构域 (*KGP-hag*) 的基因片段, 将基因片段插入 pGEM-T easy Vector, 通过限制性酶切和核苷酸序列分析鉴定, *KGPcd* 和 *KGP-hag* 的序列与国外文献报道一致。克隆到牙龈卟啉菌 *KGP* 的 *KGPcd* 和 *KGP-hag* 基因, 为体外表达其活性蛋白奠定了基础。

关键词: 牙龈卟啉菌, 牙龈蛋白酶 K, 序列测定和分析

中图分类号: Q785 R780.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0079-03

CLONING AND SEQUENCING ANALYSIS OF GINGIPAIN K OF PORPHYROMONAS GINGIVALIS

ZHANG Feng-Qiu YANG Lian-Jia WU Zhi-Fen YANG Ju-Cai

(College of Stomatology, The 4th Military Medical University, Xian 710032)

Abstract: The desired DNA product of *KGPcd* and *KGP-hag* was obtained from the total DNA of *Porphyromonas gingivalis* by PCR with two pairs of gene specific primers. The segment of *KGPcd* and *KGP-hag* (about 1.5 kb and 1.6 kb) was inserted into pGEM-T easy Vector. The double-stranded DNA of the positive clone was analyzed by restriction endonuclease mapping and DNA sequencing. The sequences of *KGPcd* and *KGP-hag* were consistent with those of the references appeared. The proteins of *KGPcd* and *KGP-hag* will be obtained for further study.

Key words: *Porphyromonas gingivalis*, Gingipain K, Sequencing and Characterization

牙周炎是一种细菌感染性疾病, 牙龈卟啉菌 (*Porphyromonas gingivalis*, Pg) 是牙周炎的主要优势致病菌^[1]。牙龈蛋白酶是一类结构和功能十分相似的蛋白质, 是重要致病因子, 具有多种生物学活性, 在细菌粘附中起重要作用, 并具有很好的免疫原性, 可诱导机体的保护性免疫应答^[2]。本研究采用 PCR 技术克隆了 *KGP* 催化结构域 (*KGPcd*) 和凝集素结构域 (*KGP-hag*) 基因, 为体外表达其活性蛋白奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和克隆载体

Pg ATCC 33277 购自华西医科大学口腔生物实验室; 大肠杆菌 XL-10Gold 由本校医学遗传学与发育生物学教研室韩骅教授提供。

1.2 细菌 DNA 的提取

Pg ATCC 33277 接种于改良 GAM 培养基 (加 1mg/L 维生素 K₁、5% 脱纤维蛋白羊血), 在 37℃ 厌氧条件下 (N₂ 80%、H₂ 10%、CO₂ 10%) 培养 5d, 接种 2~3 个平皿, 刮下细菌, 离心收集菌体, -20℃ 保存备用。采用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (华舜生物公司) 提取 Pg DNA。获得的 DNA 采用紫外吸收法作定量和纯度检测。

* 联系人 E-mail: zhangfq@fmmu.edu.cn

收稿日期: 2002-11-11, 修回日期: 2002-12-12

1.3 引物的设计合成

根据 Okamoto^[3] 等报道的 *Pg*381 *KGP* 基因序列, 分别设计 *KGPcd* 和 *KGP-hag* 的引物如下:

KGPcd 引物 1: 5' CAT ATG GAT GTT TAT ACA GAT (21bp) 含 *Nde* I 酶切位点

引物 2: 5' TCA ACG GGA AGC TTC TGC C (19bp) 含终止密码子

KGP-hag 引物 1: 5' CAT ATG GAA GTC GAA GAC GAT TC (23bp) 含 *Nde* I 酶切位点

引物 2: 5' TCA TAC AGG ATT GAA CTG AG (20bp) 含终止密码子

1.4 多聚酶链反应 (PCR)

参考《现代分子生物学技术》^[4] 有关章节, 分别以 *Pg* DNA 为模板在 PCR 仪上进行扩增, PCR 条件: 94℃ 预变性 5 min, 进入热循环: 94℃ 变性 30s, 55℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min 30 s, 共 35 个循环。取 10μL PCR 产物进行 1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳。

1.5 PCR 产物的克隆及重组质粒的鉴定

PCR 产物用小量胶回收试剂盒 (华舜生物公司) 回收, 与 pGEM-T easy Vector 连接, 转化大肠杆菌 XL-10GOLD, 蓝白筛选。分别在 *KGPcd* 和 *KGP-hag* 的平板上随机挑取 4 个白色克隆, 进行克隆 PCR 初步鉴定。鉴定阳性者, 37℃ 振荡培养, 小量质粒抽提试剂盒提取质粒, 重组质粒分别命名为 pGEM-T-*KGPcd* 和 pGEM-T-*KGP-hag*。然后 pGEM-T-*KGPcd* 用 *Not* I、*Eco* R I 及 pGEM-T-*KGP-hag* 用 *Eco* R I、*Sca* I 进行酶切鉴定。

1.6 核苷酸序列分析

目的菌种由上海生工生物工程技术有限公司测序, 测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 数据库进行同源性分析。

2 结果

2.1 *Pg* ATCC 33277 DNA 的定量及纯度

经紫外吸收法测定, $A_{260}/A_{280} = 1.78$, 说明 DNA 纯度较高, 基本没有 RNA 及蛋白污染。DNA 质量浓度为 60 μg/mL。电泳结果显示所获得 DNA 纯度较高, 且 DNA 链均大于 23kb。

2.2 PCR 产物的获得

Pg DNA 经 PCR 扩增后, 分别得到大小约 1.5kb 和 1.6kb 的特异扩增产物 (图 1)。

2.3 重组质粒的鉴定

2.3.1 PCR 初步鉴定: 克隆 PCR 初步鉴定发现挑选的白色克隆作模板可扩增出 1.5kb 和 1.6kb 大小的 DNA 片段。(图 2)。

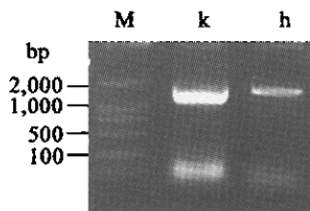


图 1 PCR 产物电泳图

M DL2000 marker, k *KGPcd*, h *KGP-hag*

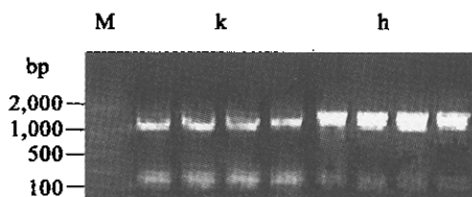


图 2 PCR 初步鉴定

M DL2000 marker, k *KGPcd*, h *KGP-hag*

2.3.2 pGEM-T-*KGPcd* 和 pGEM-T-*KGP-hag* 克隆的酶谱分析: 重组质粒 pGEM-T-*KGPcd* 经 *Not* I、*Eco* R I 及 pGEM-T-*KGP-hag* 经 *Eco* R I、*Sca* I 酶切, 分析酶切图谱, 与预期

的完全一致(图3.4)。

2.4 pGEM-T-KGPcd 和 pGEM-T-KGP-hag 克隆的序列分析

经测序,所克隆的 *KGPcd* 和 *KGP-hag* 分别为 1476bp 和 1578bp,通过 BLAST 同源性分析,同 GenBank 收录的 P9381 *KgP* 序列一致。

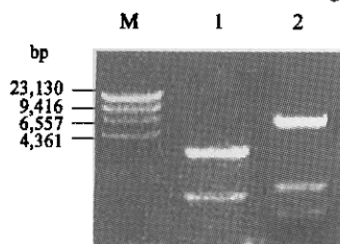


图3 pGEM-T-*KGPcd* 酶切鉴定
M λ DNA/*Hind* III marker, 1 *Not* I 酶切,
2 *Eco*R I 酶切

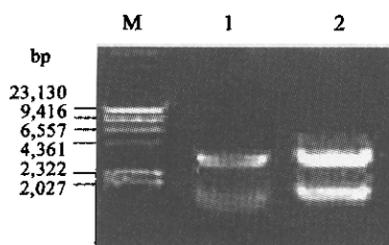


图4 pGEM-T-*KGP-hag* 酶切鉴定
M λ DNA/*Hind* III marker, 1 *Eco*R I 酶切,
2 *Sca* I 酶切

3 讨论

牙龈卟啉菌是牙周炎的主要优势致病菌,对牙龈卟啉菌的致病性研究发现该菌具有一系列逃避宿主防御机制,破坏宿主组织的毒力因子存在。目前研究较多的是牙龈卟啉菌蛋白酶,这些蛋白酶也就是以前所说的胰蛋白酶样蛋白酶,共分为两类^[5]:一为牙龈蛋白酶 R (gingipain R, 简称 RGP),作用于底物只在精氨酸处水解蛋白质,故以前也称为精氨酸特异性蛋白酶;二为牙龈蛋白酶 K (gingipain K, 简称 KGP),作用于底物只在赖氨酸处水解蛋白质,故以前也称为赖氨酸特异性蛋白酶。RGP 和 KGP 属于半胱氨酸蛋白酶,归属梭菌蛋白酶家族。研究表明,牙龈卟啉菌蛋白水解活性的 95% 以上来自于 3 个不同的等位基因的产物,即 *KGP*, *RGP-1*, *RGP-2*。

1996 年 Okamoto 等^[3]首次克隆了 *Pg* 381 *KGP* 基因全长,由 6.4kb 组成,包括全部编码区和 5' -3' 非编码区,开放读框包括 5169 个核苷酸,编码 1723 个氨基酸的蛋白,估计分子量为 218kD。在核苷酸 nt 635 ~ 641 位点上存在 TATA 盒,nt 652 ~ 654 位点上有 ATG 启动密码子,后接一信号序列。KGP 最初转录后的产物有 4 个功能区,即信号肽、N-端前序列、成熟蛋白酶结构域、C-端血凝集素结构域。KGP 最初的前体由细胞分泌到胞外后经过了完全加工。由于其广泛的生物学活性及在牙周炎致病中的作用,因而越来越受到学者们的关注。本实验利用已发表 *Pg* 381 *KGP* 序列,设计引物,采用 PCR 方法从 *Pg* ATCC 33277 DNA 中分别扩增出 *KGP* 的 *KGPcd* 和 *KGP-hag* 的基因片段,克隆到 pGEM-T easy Vector,经酶切鉴定和测序证实与 *Pg* 381 *KGP* 序列一致,为今后进一步表达该蛋白酶、研究其功能奠定了基础。

参考文献

- [1] Winkelhoff A J, Steenberg T J M, Graf J. J Clin Periodontol, 1998, 15: 145 ~ 155.
- [2] Booth V L. J Periodont Res, 1997, 32: 54 ~ 56.
- [3] Okamoto K, Kadoeaki T, Nakayama K, et al. J Biochem, 1996, 120: 398 ~ 406.
- [4] 金冬雁,黎孟枫等译.分子克隆实验指南.北京:科学出版社,2002. 679 ~ 682.
- [5] Pike R, McGraw W, Potempa J, et al. J Bio Chem, 1994, 269: 406 ~ 411.