

大肠杆菌外膜蛋白酶 T 及其突变体的表达、 复性及生物活性分析

刘晓露¹ 惠长野¹ 赵铁¹ 彭亮¹ 张文炳¹ 黄胜和² 曹虹^{1*}

(1. 南方医科大学 公共卫生与热带医学学院微生物学系 广东 广州 510515)

(2. 南加州大学 洛杉矶儿童医院 美国 洛杉矶 90027)

摘要: 外膜蛋白酶 T (Outer-membrane protease T, OmpT) 是定位于大肠杆菌外膜, 具有高度底物特异性的蛋白水解酶。本文旨在建立克隆表达膜蛋白 OmpT 和体外复性的方法, 考察其蛋白酶活性。首先以大肠杆菌基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *ompT* 基因, 连接至 pET28a (pET-ompT), 引入点突变 Asp85Ala, 构建表达质粒 pET-ompT85。然后将两种重组质粒转化入 BL21 (DE3), 均以包涵体形式大量表达。纯化后的蛋白经稀释法复性, 并加入粗制脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 恢复蛋白酶活性。通过 SDS-PAGE、鱼精蛋白水解试验及生长曲线观察表明, 重组蛋白 OmpT 在体外能水解抗菌肽鱼精蛋白和兔肌肉肌酸激酶, 而 OmpT 突变体则无上述功能。上述结果表明本文获得了具有蛋白水解酶功能的重组蛋白 OmpT, 该蛋白在体外可保护大肠杆菌抵抗鱼精蛋白的杀菌作用。

关键词: 大肠杆菌, 外膜蛋白 T, 突变体, 生物活性

Expression, refolding and characterization of *Escherichia coli* outer membrane T and its mutant

LIU Xiao-Lu¹ HUI Chang-Ye¹ ZHAO Tie¹ PENG Liang¹ ZHANG Wen-Bing¹
HUANG Sheng-He² CAO Hong^{1*}

(1. Department of Microbiology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

(2. Children's Hospital Los Angeles, University of Southern California, Los Angeles, CA 90027, USA)

Abstract: OmpT, located in *Escherichia coli* (*E. coli*) outer membrane, is a protease that demonstrates highly substrate specificity. In order to establish the approaches for expression and refolding of membrane protein OmpT, and examine the demonstrated protease activity of OmpT, the *ompT* gene was first amplified by PCR and inserted into pET28a (pET-ompT) and introduced by Asp85Ala site-directed

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 30972637)

* 通讯作者: Tel: 86-20-61648723; Fax: 86-20-61648307; ✉: gzhaoc@fimmu.com

收稿日期: 2011-03-11; 接受日期: 2011-06-01

mutagenesis to generate mutant Asp85Ala (pET-ompT85). Then, the two recombinant plasmids were transformed into BL21 (DE3), OmpT and the mutant were expressed in the form of inclusion bodies, purified and refolded by N-Dodecyl-N,N-dimethyl-1-ammonio-3-propanesulphonate. The addition of lipopolysaccharide (LPS) to the recombinant OmpT was critical to refold its protease activity *in vitro*. Finally, the ability of the recombinant wide-type OmpT to hydrolyze protamine and rabbit muscle creatine kinase (RMCK) was confirmed by SDS-PAGE, bacteria agglutination and growth curve in contrast to the mutant. The results suggest that the desired recombinant OmpT was obtained, which showed the significant protease activity in the protection of *E. coli* against protamine *in vitro*.

Keywords: *Escherichia coli*, OmpT, Mutant, Bioactivity

大肠杆菌外膜蛋白酶 T (Outer-membrane protease T, OmpT) 定位于大肠杆菌外膜, 属于革兰氏阴性菌 omptin 外膜蛋白家族。该家族还包括鼠疫耶尔森菌的 Pla、沙门氏菌的 PgtE 和福氏志贺菌的 SopA, 它们多与致病相关。OmpT 编码基因 *ompT* 在尿路感染和脑膜炎临床分离株中的检出率很高, 是假定的致病性大肠杆菌的毒力相关因子^[1-4]。此外, OmpT 可水解抗菌肽, 促纤溶等, 均有利于细菌在尿路的存活^[5-6]。为更好地研究 OmpT 的致病相关机制, 我们对 OmpT 及其点突变体进行了重组表达及体外复性。

本研究克隆了大肠杆菌 *ompT* 基因, 并将 *ompT* 起始密码子开始第 314 位碱基由 A 突变为 C, 即蛋白翻译框 GAC 变成 GCC, 使活性中心的 Asp85 变为 Ala, 并利用原核表达系统实现了 OmpT 及突变体的高效表达。包涵体经洗涤及 Ni²⁺-NTA 纯化、稀释复性得到有活性的 OmpT, 突变体经相同复性处理也形成了类似的空间构象, 却丧失了酶活性, 这些都为研究 OmpT 酶活性是否为细菌致病所必需打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 BL21 (DE3)、尿路致病性大肠杆菌 CFT073 (Uropathogenic *Escherichia coli* CFT073)、原核表达载体 pET28a 为本室保存; 本实验所用引物均由上海生工生物工程有限公司合成; Pyrobest DNA Polymerase、限制性内切酶 *Nco* I、*Eco* R I、T4 DNA Ligase、DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司; 质

粒小提试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒均购自天根生化科技有限公司; 兔肌肉肌酸激酶(Rabbit muscle creatine kinase, RMCK)、LPS、十二烷基磺基甜菜碱购自 Sigma 公司; 蛋白 Marker 和点突变试剂盒为碧云天生物技术公司产品。

1.2 方法

1.2.1 基因 *ompT* 的克隆和重组质粒的构建: 根据 GenBank 公布的尿路致病性大肠杆菌 CFT073 *ompT* 序列(Gene ID: 004431), 设计扩增引物 T-F 和 T-R (表 1), 下划线部分为引入的 *Nco* I、*Eco* R I 酶切位点, 加粗字体部分为 His 标签编码序列。提取 CFT073 的全基因组, 以基因组为模板扩增 *ompT*。PCR 扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳鉴定, 进行胶回收纯化后, 用 *Nco* I 和 *Eco* R I 限制性内切酶进行双酶切, 通过 T4 DNA Ligase 连接到同样经过 *Nco* I 和 *Eco* R I 双酶切的表达载体 pET28a 上, 构建重组质粒 pET-ompT。将重组质粒转化到宿主菌 BL21 (DE3)。经卡那霉素抗性平板筛选, 挑取阳性克隆扩大培养提取质粒, 进行 PCR 和双酶切鉴定后送公司测序。

表 1 目的基因 *ompT* 的扩增引物

Table 1 PCR primers of *ompT*

引物 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
TMF	ACA <u>ACC</u> ATGGGCCATCATCATCATCATCAT TCTACCGAGACTTTATCG
TMR	CCG <u>AATT</u> CTTAAAATGTGTACTTAAGAC
MMF	TCAGGCCTGGATGGATTCC
TMR	CCG <u>AATT</u> CTTAAAATGTGTACTTAAGAC

1.2.2 基因 *ompT85* 位天冬氨酸定点突变: 首先设计了点突变扩增引物(表 1)。加粗字体为预期的突变位点, 该位点位于 *ompT* 起始密码子后第 314 位, 原为腺嘌呤(A)。以重组质粒 pET-*ompT* 为模板, M-F 和 M-R 为引物, 根据点突变试剂盒说明书操作筛选得到点突变后的重组质粒, 命名为 pET-*ompT85*, 以该重组质粒表达得到 85 位氨基酸由 Asp 突变为 Ala 的 *OmpT*。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达: 将分别转化有重组质粒 pET-*ompT* 和 pET28a-*ompT85* 的 *E. coli* BL21 (DE3) 在 LB 液体培养基中活化过夜, 次日接种到含有卡那霉素(终浓度为 50 g/L)的 LB 培养基中 37 °C、180 r/min 培养 3 h, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 °C 诱导 4 h。

1.2.4 包涵体的纯化和复性: 将 IPTG 诱导后的产物 8 000 r/min 离心 15 min 收集菌体, 加入 PBS 液重悬菌体, 进行超声破碎, 超声条件为开 5 s, 停 9 s, 一共 80 次。然后以 10 000 r/min、4 °C 离心 15 min, 分别取上清和沉淀进行 12% SDS-PAGE 电泳检测。确定蛋白以包涵体形式表达后, 把收集的沉淀经含有低浓度表面活性剂及变性剂的清洗液室温下清洗, 最后把包涵体溶解于 buffer A (8 mol/L 尿素, 50 mmol/L 甘氨酸, pH 8.3) 中, 10 000 r/min、4 °C 离心 15 min 收集上清。将上清通过 Ni²⁺-NTA 柱进行纯化。利用稀释复性法, 将纯化后的蛋白(浓度为 2.5 g/L)缓慢滴加到 320 mL 终浓度为 31.25 mmol/L 的十二烷基磺基甜菜碱的 PBS 溶液中, 4 °C 搅拌过夜复性。取复性后的蛋白溶液进行 12% SDS-PAGE 电泳检测, 样品液加入 1/5 体积 5×loading buffer [250 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8); 10% (W/V) SDS; 0.5% (W/V) 溴酚蓝; 50% (V/V) 甘油; 5% (W/V) β-巯基乙醇], 一份 100 °C 煮沸 10 min, 充分变性; 另一份不经热处理直接进行电泳分析。蛋白复性成功后, 将蛋白溶液在 buffer B (10 mmol/L 十二烷基磺基甜菜碱, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 中充分透析去除表面活性剂, 所得蛋白溶液加入 1 mg/L LPS 于 4 °C 缓慢搅拌过夜以恢复蛋白酶活性, 再透析去除 LPS。

1.2.5 体外酶活测定: (1) 利用 SDS-PAGE 分析

OmpT 及其突变体的水解活性。

RMCM 序列中有 5 处成对碱性氨基酸可作为 *OmpT* 底物, 被分解为数个小片段。而 *OmpT* 自身序列中也有 3 处成对碱性氨基酸可水解自身^[10]。根据 *OmpT* 这些特性, 利用 RMCK 水解法分析 *OmpT* 酶活性。RMCK 水解法: RMCK (1 g/L), *OmpT* (0.1 g/L), *OmpT* 突变体(0.1 g/L), DTT (1 mmol/L), 50 mmol/L Tris, pH 8.5, 混匀, 37 °C 孵育 1 h。另外取 *OmpT*、*OmpT* 突变体单独 37 °C 孵育 1 h。分别取样进行 SDS-PAGE 分析。

(2) *OmpT* 及其突变体水解鱼精蛋白。鱼精蛋白是一种抗菌肽, 可被 *OmpT* 水解。在 50 μL 0.1 g/L 鱼精蛋白中分别加入 50 μL 0.5 g/L *OmpT* (命名为混合物 1) 和 50 μL 0.5 g/mL *OmpT* 突变体(命名为混合物 2)。

取 1 mL 过夜培养的大肠杆菌 BL21 (DE3) 离心去上清, 加入 300 μL 0.1 mol/L PBS 重悬菌体, 取 50 μL BL21 (DE3) 分别加入 50 μL 的 0.1 mol/L PBS, 0.05 g/L 鱼精蛋白, 混合物 1 及混合物 2, 混匀, 分别涂于载玻片中, 经过自然干燥、火焰固定, 用石碳酸复红稀释液染色 90 s, 流水脱色, 在油镜下观察。

(3) 利用生长曲线法观察 *OmpT* 及其突变体对大肠杆菌 BL21 (DE3) 的保护作用。将过夜培养的 BL21 (DE3) 接种进新鲜的 LB 培养基, 37 °C、180 r/min 培养, 待细菌进入对数生长期时, 分别加入鱼精蛋白、混合物 1 和混合物 2, 鱼精蛋白的终浓度均为 0.01 g/L。每隔 2 h 取样, 绘制细菌生长曲线。

2 结果与分析

2.1 基因 *ompT* 克隆、重组质粒 pET-*ompT* 以及点突变后重组质粒 pET-*ompT85* 鉴定

以 CFT073 全基因组为模板扩增的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 在约 1 kb 处有清晰可见的条带, 与基因 *ompT* 大小相符(图 1A)。构建的质粒 pET-*ompT* 经 *Nco* I 和 *Eco*R I 双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 得到大小约 1 kb 和 5 kb 的片段, 与预期相符(图 1B)。进一步进行测序, 结果证明重组

质粒构建成功。对 pET-ompT 点突变后构建的重组质粒 pET28-ompT85 进行 PCR 鉴定, 对其产物进行琼脂糖凝胶电泳得到约 1 kb 大小的片段(图 1A)。同样, 对该质粒双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳, 得到大小约 1 kb 和 5 kb 的片段, 与预期相符(图 1B)。测序结果显示, 从 ATG 开始第 314 位碱基由 A 突变为 C, 证明点突变重组质粒 pET-ompT85 构建成功。

2.2 重组质粒 pET-ompT 表达纯化以及包涵体复性

重组质粒 pET-ompT 加入 IPTG 诱导表达后, 取诱导前和诱导后的样品进行 12% SDS-PAGE 分析, 诱导后样品在 37 kD 左右出现明显条带(图 2, lane 2), OmpT 得到高效表达。将诱导后的样品进行超声破碎菌处理, 电泳分析表明 OmpT 以包涵体形式存在于沉淀中。

将洗涤得到的包涵体(图 2, lane 3)溶解后, 经过 Ni²⁺-NTA 纯化去除大部分杂蛋白(图 2, lane 4), 纯化后的 OmpT 经稀释复性, 取已复性的 OmpT 加入 loading buffer 后, 比较经充分热变性(图 2, lane 5)

及未热变性处理样品(图 2, lane 6)的分子量, 12% SDS-PAGE 电泳结果为热变性的蛋白分子量为 37 kD, 未经热变性的蛋白分子量较热变性后的小, 为 33.5 kD。突变体表达质粒 pET-ompT85 的诱导表达、纯化及复性结果与野生型表达质粒 pET-ompT 一致(结果未显示)。

2.3 体外酶活测定

2.3.1 将 RMCK 与 OmpT 及其突变体分别混匀孵育:

取样进行 SDS-PAGE 分析(图 3), RMCK 在约 43 kD 处清晰可见有 1 条带(lane 1); 加入 OmpT 孵育后 43 kD 处未见条带, 只见约 20 kD 有 1 条带, 小于 16 kD 处有 2 个条带(lane 2); 而 OmpT 单独孵育后的电泳分析显示, 在约 20 kD 处见 1 条带(lane 4), 小于 OmpT 理论分子量 37 kD, OmpT 被水解, 而该条带与 lane 2 中条带相符, 表明 RMCK 与 OmpT 共同孵育时, 两者都被降解。加入 OmpT 突变体孵育后, 在 43 kD 和 37 kD 处各有 1 个条带, 与 RMCK 及 OmpT 突变体的理论分子量相符, 表明 RMCK 以及 OmpT 匀未被水解(lane 3)。

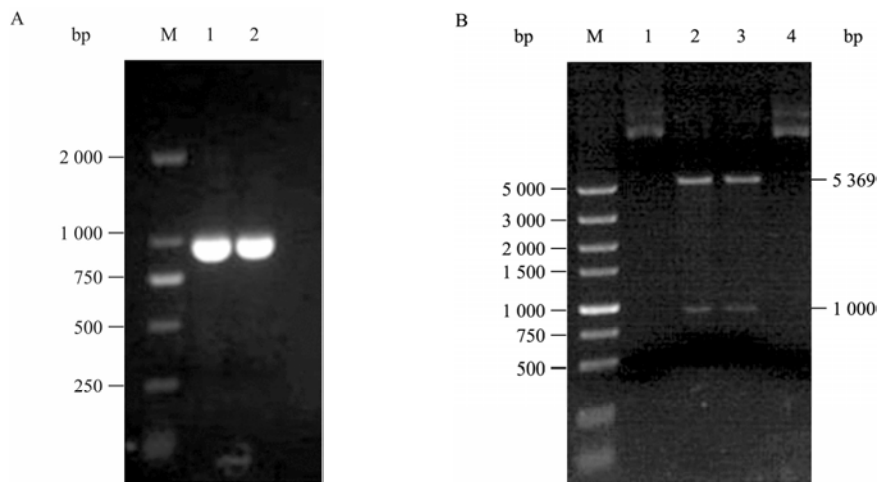


图 1 *ompT* 和 *ompT85* 的 PCR 扩增及质粒 pET-ompT 和点突变重组质粒 pET-ompT85 双酶切鉴定

Fig. 1 Amplification of *ompT* and the mutant and the identification of recombinant plasmid pET-ompT and pET-ompT85

注: A: *ompT* 和 *ompT85* DNA PCR 产物; M: DNA 标准分子量; 1: *ompT* DNA PCR 产物; 2: *ompT85* DNA PCR 产物。B: 重组质粒 pET-ompT 和 pET-ompT85 的双酶切鉴定; M: DNA 标准分子量; 1: pET-ompT; 2: pET-ompT 双酶切产物; 3: pET-ompT85 双酶切产物; 4: pET-ompT85。

Note: A: PCR amplification of *ompT* and *ompT85*. M: DNA Marker; 1: PCR product of *ompT*; 2: PCR product of *ompT85*. B: Identification of recombinant plasmid pET-ompT and pET-ompT85 by double enzyme digestion with *Nco* I and *Eco*R I. M: DNA marker; 1: pET-ompT; 2: pET-ompT after digestion; 3: pET-ompT85 after digestion; 4: pET-ompT85.

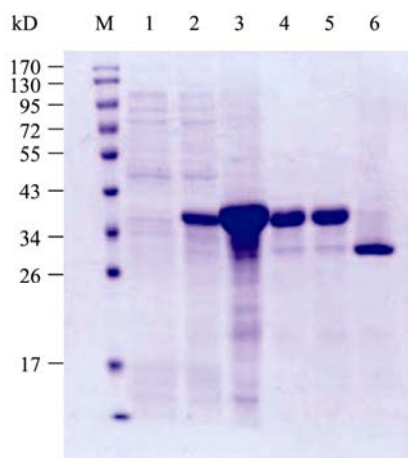


图 2 外膜蛋白 OmpT 原核表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 12% SDS-PAGE analysis of OmpT expression

注: M: 蛋白标准分子量; 1: BL21 (DE3)/pET-ompT; 2: IPTG 诱导后的 BL21 (DE3)/pET-ompT; 3: OmpT 包涵体; 4: 纯化后的 OmpT; 5: OmpT 重折叠(加热); 6: OmpT 重折叠(未加热).

Note: M: Protein maker; 1: Cell lysate of BL21 (DE3)/pET-ompT; 2: BL21 (DE3)/pET-ompT induced with IPTG; 3: Isolated inclusion bodies of OmpT; 4: The purified protein; 5: The refolding OmpT (boiled); 6: The refolding OmpT (Not boiled).

2.3.2 镜检: BL21 (DE3)加入鱼精蛋白后肉眼可见细菌死亡漂浮, 在油镜下观察可见细菌成团聚集(图 4B), 而加入 PBS 的对照组 BL21 (DE3)显示革兰阴性大肠杆菌的正常形态(图 4A); 加入混合物 1 的 BL21 (DE3)肉眼未见细菌成团漂浮, 在油镜下观察见细菌形态正常, 分布均匀(图 4C); 加入混合物 2 的 BL21 (DE3)同样见细菌成团聚集(图 4D)。

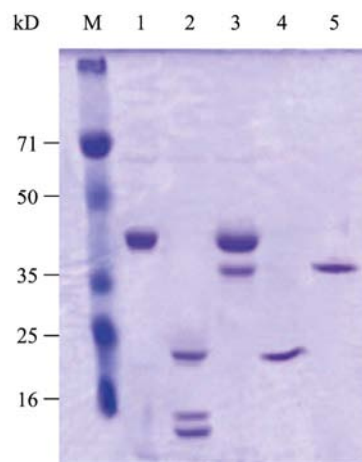


图 3 外膜蛋白 OmpT 及其突变体水解 RMCK 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 12% SDS-PAGE analysis of RMCK hydrolyzed by OmpT and its mutant

注: M: 蛋白标准分子量; 1: RMCK; 2: 与 OmpT 孵育后的 RMCK; 3: 与 OmpT 突变体孵育的 RMCK; 4: OmpT 37 °C 单独孵育 1 h; 5: OmpT 突变体 37 °C 单独孵育 1 h.

Note: M: Protein marker; 1: RMCK; 2: RMCK hydrolyzed by OmpT; 3: RMCK hydrolyzed by OmpT mutant; 4: OmpT incubated in 37 °C for 1 h; 5: OmpT mutant incubated in 37 °C for 1 h.

2.3.3 生长曲线: 加入鱼精蛋白后, BL21 (DE3)在 6 h 以前的生长都被抑制, 6 h 缓慢恢复生长, 但仍未能达到正常生长水平。加入与 OmpT 孵育的鱼精蛋白后, BL21 的生长并未受到明显影响。而加入与 OmpT 突变体孵育的鱼精蛋白后, BL21 的生长同样受到抑制(图 5)。

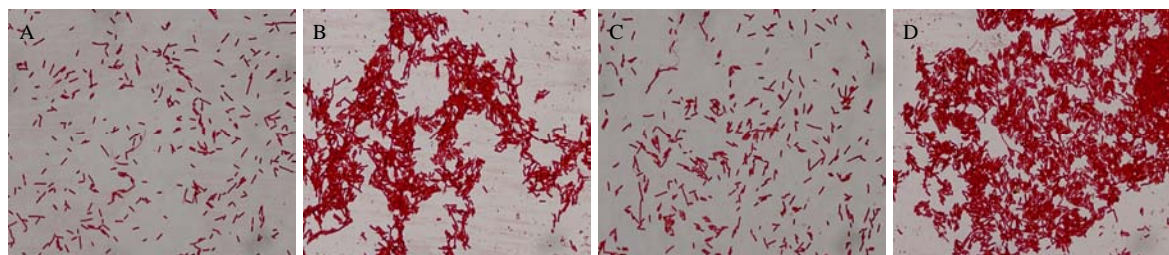


图 4 大肠杆菌 BL21 (DE3)及加入鱼精蛋白、混合物 1 和混合物 2 后的形态观察

Fig. 4 The observation of *E. coli* BL21 (DE3) and the addition of protamine, mixture 1, mixture 2 to BL21 (DE3)

注: A: *E. coli* BL21 (DE3); B: BL21 (DE3)加入鱼精蛋白; C: BL21 (DE3)加入混合物 1; D: BL21 (DE3)加入混合物 2.

Note: A: *E. coli* BL21 (DE3); B: Addition of protamine to BL21 (DE3); C: Addition of mixture 1 to BL21 (DE3); D: Addition of mixture 2 to BL21 (DE3).

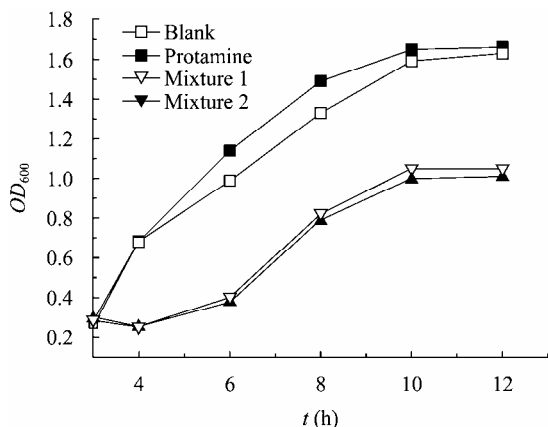


图5 大肠杆菌 BL21 (DE3)以及分别加入鱼精蛋白、混合物 1 和混合物 2 后的生长曲线图

Fig. 5 The growth curve of BL21 (DE3) and the addition of protamine, mixture 1, mixture 2 to BL21 (DE3)

注: —■—: BL21 (DE3); —▼—: BL21 (DE3)与鱼精蛋白共同孵育; —□—: BL21 (DE3)与混合物 1 共同孵育; —▽—: BL21 (DE3)与混合物 2 共同孵育.

Note: —■—: BL21 (DE3); —▼—: BL21 (DE3) culturing with protamine; —□—: BL21 (DE3) culturing with mixture 1; —▽—: BL21 (DE3) culturing with mixture 2.

以上实验结果均表明,重组质粒表达 OmpT 可成功复性并恢复酶活,对抗菌肽鱼精蛋白及 RMCK 有很强的水解能力。而 OmpT 突变体则丧失了酶活性。

3 讨论

OmpT 由 10 条反向平行的 β 片层折叠而成中空的桶状结构,对 OmpT 酶活性影响最大的氨基酸位于分子的顶端,分别为 Asp83, Asp85, Asp210 和 His 212 (见图 6 粉色球),是假定的活性中心位点氨基酸^[7]。对 OmpT 活性影响较小的氨基酸为 Glu27, Asp97, Asp208 和 His101 (见图 6 中黄色球)。对 OmpT 活性影响介于前两者之间的为 Ser99 (见图 6 中橙色球)。Asp83-Asp85 和 Asp210-His 212 以成对形式位于活性中心沟槽的相对位置。据文献报道,Asp83 和 His 212 之间有一个水分子,Asp83-Asp85 可能间接催化该分子,形成亲核反应水解易断的肽链,除此之外,Asp83-Asp85 的羧基基团可以稳定

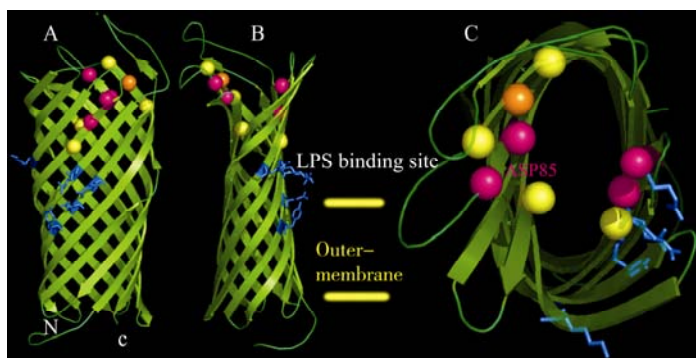


图6 大肠杆菌外膜蛋白酶 T 结构的三维图

Fig. 6 The three-dimensional crystal structure of *E. coli* OmpT

注: 外膜位置见黄线,催化位点位于蛋白水解酶 OmpT 的顶端(用球形表示),蓝色部分表示 LPS 的假定结合位点,图 B 旋转 90° 为图 A。图 C 为 OmpT 活性位点,图 B 的垂直面。暗粉色小球分别代表位点 Asp83, Asp85, Asp210 和 His 212; 橙色小球代表 Ser99; 黄色小球分别代表 Glu27, Asp97, Asp208 和 His101。本图用 PyMol 软件根据 OmpT 在 X 射线下的结构图(PDB ID 1178)制作。

Note: The position of the outer membrane is showed by yellow lines. The catalytic residues (spheres representation) are located at the top of protease OmpT, and the blue-colored residues show the putative LPS-binding site. The orientation of B is rotated 90° with respect to A. C is active site of OmpT. Orientation vertical to B. The hotpink spheres show Asp83, Asp85, Asp210 and His 212 respectively; the orange sphere shows Ser99; the yellow spheres show Glu27, Asp97, Asp208 and His101 respectively. The figure was generated using x-ray structure of OmpT (PDB ID 1178) with program PyMol.

反应中的氧离子中间体^[8-11]。本实验对 OmpT Asp85 进行点突变, 发现天冬氨酸突变为丙氨酸后并不影响蛋白的重折叠, 然而其水解酶活性却丧失。

OmpT 定位到外膜, 镶嵌在脂质双层中。由于 OmpT 自身序列存在成对碱性氨基酸, 其蛋白酶的活性容易把自身作为底物水解, 不利于纯化。因此本实验在设计扩增引物时去除信号肽部分, 使得 OmpT 以包涵体的形式大量表达, 而且还可以分离 OmpT 与其他膜蛋白和外膜脂质。这种方法的缺点在于需要进行蛋白复性。在复性过程中, 我们分别选择 Triton X-100 和、十二烷基磺基甜菜碱作为表面活性剂, 结果表明用后者复性成功。OmpT 是膜蛋白, 疏水性强, 在水溶液中容易聚集沉淀。而作为两性表面活性剂, 十二烷基磺基甜菜碱的界面活性较好, 吸附在正、负电荷的界面上也不会形成疏水性界面^[12-13], 更适合用于膜蛋白的复性。

据文献报道, 折叠但不加入 LPS 的 OmpT 未能获得酶活性, LPS 不引起 OmpT 结构的明显改变, 表明加入 LPS 对体外恢复 OmpT 酶活性至关重要^[14]。LPS 为革兰氏阴性菌的细胞壁组成成分, 由脂质双层向细胞外伸出。LPS 含有不同的糖类以及带负电荷的底物等, 这些大分子可能与 LPS 的活化作用有关, 但其机制未有定论^[14]。由于 OmpT 从细胞质运输到内膜, 再通过外周胞质到达外膜, 如果在这个过程中 OmpT 存在酶活性则会对其他蛋白及自身有水解作用。因此推测, OmpT 与 LPS 结合后才会恢复酶活性, 避免其对其他蛋白及自身的损害。OmpT 中的 LPS 结合位点见图 6 中的蓝色部分。

与 Kramer RA 等构建的 OmpT 表达纯化复性方法相比^[15], 本研究利用 pET 原核表达系统, 在重组蛋白中加入 His 融合标签, 只需通过 1 次 Ni²⁺-NTA 柱进行纯化, 使表达纯化更简单、高效。

参 考 文 献

- [1] Foxman B, Zhang LX, Palin P, et al. Bacterial virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from first-time urinary tract infection[J]. *J Infect Dis*, 1995, 171(6): 1514-1521.
- [2] 惠长野, 郭研, 吴书驰, 等. 大肠杆菌 K1 致病株外膜蛋白 T 体外功能[J]. *微生物学报*, 2010, 50(1): 48-53.
- [3] Haiko J, Suomalainen M, Ojala T, et al. Invited review: breaking barriers--attack on innate immune defences by omptin surface proteases of enterobacterial pathogens[J]. *Innate Immun*, 2009, 15(2): 67-80.
- [4] Xie Y, Parthasarathy G, Di Cello F, et al. Transcriptome of *Escherichia coli* K1 bound to human brain microvascular endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 365(1): 201-206.
- [5] Hui CY, Guo Y, He QS, et al. *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT confers resistance to urinary cationic peptides[J]. *Microbiol Immunol*, 2010, 54(8): 452-459.
- [6] Stumpe S, Schmid R, Stephens DL, et al. Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*[J]. *J Bacteriol*, 1998, 180(15): 4002-4006.
- [7] Vandeputte-Rutten L, Kramer RA, Kroon J, et al. Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site[J]. *EMBO J*, 2001, 20(18): 5033-5039.
- [8] Kramer RA, Vandeputte-Rutten L, de Roon GJ, et al. Identification of essential acidic residues of outer membrane protease OmpT supports a novel active site[J]. *FEBS Lett*, 2001, 505(3): 426-430.
- [9] Kramer RA, Dekker N, Egmond MR. Identification of active site serine and histidine residues in *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT[J]. *FEBS Lett*, 2000, 468(2): 220-224.
- [10] White CB, Chen Q, Kenyon GL, et al. A novel activity of OmpT[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(22): 12990-12994.
- [11] McCarter JD, Stephens D, Shoemaker K, et al. Substrate specificity of the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT[J]. *J Bacteriol*, 2004, 186(17): 5919-5925.
- [12] 刘军, 徐桂英, 李一鸣, 等. 十二烷基磺基甜菜碱与其它类型表面活性剂的相互作用[J]. *山东大学学报: 理学版*, 2005, 40(3): 90-94.
- [13] 方敏, 黄华梁. 包涵体蛋白体外复性的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2001, 17(6): 608-612.
- [14] Kramer RA, Brandenburg K, Vandeputte-Rutten L, et al. Lipopolysaccharide regions involved in the activation of *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT[J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(6): 1746-1752.
- [15] Kramer RA, Zandwijken D, Egmond MR, et al. *In vitro* folding, purification and characterization of *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT[J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267(3): 885-893.