

高粱外种皮原花青素四聚体对远缘链球菌 6715 粘附的影响

田晶¹, 鲁群¹, 鲁亮², 张永霞², 刘睿¹

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 环境食品学教育部重点实验室, 湖北武汉 430070)

(2. 普健生物(武汉)科技有限公司, 湖北武汉 430070)

摘要: 本文研究高粱外种皮原花青素四聚体(sorghum episperm procyanidin tetramer, SEPT)对远缘链球菌 6715 (*S. sobrinus* 6715) 初始粘附及其致龋毒力因子-葡萄糖基转移酶(glucosyltransferase, GTF)的抑制效果。采用唾液包被羟基磷灰石(saliva coated hydroxylapatite, SHA)体外模型研究 SEPT 对 *S. sobrinus* 6715 初始粘附的影响。通过 PCR 扩增 *S. sobrinus* 6715 GTF-I 的催化活性区(catalytic region, CAT)的基因片段到质粒 Pgex-4T-1 中, 转化至大肠杆菌 T7 Express competent, IPTG 诱导表达, 纯化浓缩表达产物, 获得目标蛋白 GTF-I/CAT。再用不同浓度 SEPT 处理 GTF-I/CAT, 根据其水不溶性多糖产量(water insoluble glucosyltransferase, WIS)评价 SEPT 对 GTF-I/CAT 酶活力的抑制。实验结果表明, SEPT 能够有效抑制 *S. sobrinus* 6715 在 SHA 的初始粘附, 并具有一定的浓度效应关系; 通过基因克隆表达获得的 GTF-I/CAT 蛋白酶活为 8.446 mIU, 产多糖能力为 1.603 mg/(mg·h)。SEPT 能明显抑制 GTF-I/CAT 产生 WIS ($p < 0.01$)。说明 SEPT 既可以有效抑制 *S. sobrinus* 6715 的初始粘附过程, 又可以通过作用 GTF-I 的 CAT 区减少 WIG 的合成, 抑制蔗糖依赖性粘附减少 *S. sobrinus* 6715 在牙齿表面的粘附聚集, 从而干预龋齿的发生。

关键词: 远缘链球菌 6715; 粘附; 葡萄糖基转移酶; 抑制

文章编号: 1673-9078(2017)2-48-54

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.2.008

Effect of Procyanidin Tetramer from Sorghum Episperm on the Adherence of *Streptococcus sobrinus* 6715

TIAN Jing¹, LU Qun¹, LU Liang², ZHANG Yong-xia², LIU Rui¹

(1.Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China) (2.PuJian Biological Technology Co., LTD., Wuhan 430070, China)

Abstract: The inhibitory effect of sorghum episperm procyanidin tetramer(SEPT) on the initial adherence of *Streptococcus sobrinus* 6715 and its cariogenic factor glucosyltransferase (GTF) was investigated. The saliva-coated hydroxyapatite (SHA) was used as an *in vitro* model to measure the inhibitory effect of SEPT on the initial adherence of *S. sobrinus* 6715. The GTF-I catalytic region (CAT) gene of *S. sobrinus* 6715 was amplified by polymerase chain reaction (PCR), cloned into a Pgex-4T-1 vector, and transformed into T7 Express competent of *Escherichia coli*. The protein expression was induced by isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), and the expressed product was purified and concentrated to obtain the GTF-I/CAT target protein. Subsequently, different concentrations of SEPT samples were used to treat GTF-I/CAT, and the inhibitory effect of SEPT on GTF-I/CAT enzyme activity was determined based on the amount of water-insoluble glucan (WIG) formed by GTF-I/CAT. The results showed that SEPT could effectively decrease the initial adherence of *S. sobrinus* 6715 to SHA in a dose-dependent manner. The enzyme activity of GTF-I/CAT obtained from the gene cloning and expression was 8.446 mIU and the WIG formation ability was 1.603 mg/(mg·h). SEPT could effectively suppress the formation of WIG by acting on GTF-I/CAT ($p < 0.01$). The results demonstrated that SEPT was effective in inhibiting the initial adherence of *S. sobrinus* 6715 to SHA and reducing WIG synthesis by acting on the CAT region of GTF-I. Therefore, SEPT can decrease the adhesion and aggregation of *S. sobrinus* 6715 on tooth surface and inhibit the sucrose-dependent adherence, thereby preventing the occurrence of dental caries.

Key words: *Streptococcus sobrinus* 6715; adherence; glucosyltransferase; inhibition

收稿日期: 2016-01-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31271939)

作者简介: 田晶 (1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物化学与分子生物学

通讯作者: 刘睿 (1969-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物

远缘链球菌 (*Streptococcus sobrinus*, *S. sobrinus*) 是一种重要的致龋菌, 它的产酸性、耐酸性以及葡萄糖基转移酶活性更强, 以致具有更强的致龋齿能力^[1]。致龋菌通过粘附聚集于牙齿表面形成牙菌斑, 在代谢环境中的糖产酸造成牙组织脱矿, 从而导致龋齿。细菌在牙齿表面的粘附聚集包括两个阶段: 初始粘附阶段, 细菌与牙齿表面的唾液获得性膜结合; 蔗糖依赖性粘附, 致龋菌的葡萄糖基转移酶 (glucosyltransferase, GTF) 利用蔗糖产生水不溶性多糖 (water insoluble glucan, WIG), 介导细菌对牙齿表面的不可逆粘附, 使其具有更强的粘附稳定性。因此, 有效阻断致龋菌的粘附和聚集, 就可以从根本上抑制龋齿的发生。

唾液包被羟基磷灰石 (saliva coated hydroxylapatite, SHA) 体外模拟实验通常被用来研究抗龋成分对致龋菌的初始粘附抑制情况^[2,3]; 而采用硫酸铵盐沉淀法获得 GTF 粗酶, 通过抑制 GTF 粗酶合成 WIG 研究抗龋成分对 GTF 酶活力的影响^[4,5]。但由于 GTF 粗酶成分复杂, 难以明确解释抗龋成分与 GTF 中发生作用的具体成分或结构以及防龋机理, 促使研究者另辟蹊径获得成分明确、纯度高的 GTF 为材料, 研究抗龋成分对 GTF 的抑制效果和机理。*S. sobrinus* 可合成 4 种 GTFs, 分别是 GTF-I (water insoluble glucosyltransferase)、GTF-S₁、S₂、S₃ (water soluble glucosyltransferase), 其中 GTF-I 合成 WIG, 另外 3 种合成水溶性多糖 (water soluble glucan, WSG), WIG 在促进致龋菌的进一步粘附、聚集以及形成牙菌斑的过程中起着主要作用^[6]。*S. sobrinus* 6715 GTF-I 的基因全长 5.1 kb, 位于氨基端 1/3 处的催化活性区 (catalytic region, CAT) 有 GTF-I 的催化活性位点, 是 GTF-I 的重要功能区, 具有催化蔗糖产生 WIG 的活性^[7,8]。已有研究者通过基因工程的方法获得具有生物活性的变形链球菌 GTF-I 的 CAT 区蛋白^[9,10], 但通过基因工程的方法获得具有生物活性的 *S. sobrinus* GTF-I 的 CAT 区蛋白并与抗龋齿活性成分作用的相关研究鲜见文献报道。

原花青素是一种从植物中分离得到的天然活性多酚, 其抗龋齿功效不断被报道, 我们前期研究发现在原花青素低聚体中四聚体的抗龋功效更值得关注^[2,11]。本实验以 SEPT 为原料, 采用 SHA 体外模型, 用 SEPT 分别处理细菌和 SHA 上的唾液获得性膜, 研究 SEPT 对 *S. sobrinus* 6715 初始粘附影响的主要途径; 并采用基因克隆重组表达的方式获得成分明确、纯度高且具有生物活性的 *S. sobrinus* 6715 GTF-I 的 CAT 蛋白, 通过 SEPT 对 GTF-I/CAT 产 WIG 能力的抑制效

果评价 SEPT 对 GTF-I 酶活力的影响。初步探讨 SEPT 的防龋效果和防龋机理。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验样品

SEPT, 经大孔树脂和凝胶色谱分离纯化获得, 实验室自行制备^[9]。

1.1.2 菌种与培养基

S. sobrinus 6715 (血清型, g) 购于武汉大学口腔医院, 质粒 Pgex-4T-1、大肠杆菌 T7 Express competent *E. coli* (High Efficiency) 由武汉普健生物科技有限公司保存。

胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (Tryptic Soy Broth, TSB), 购于青岛高科园海博生物技术有限公司。

细菌基础培养基 (Luria Bertani, LB): 胰蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 酵母提取物 5 g, 蒸馏水定容至 1 L, 121 °C 高温灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂

荧光染料 BECEF/AM, 碧云天生物技术研究; 氟化钠 (NaF), 国药集团化学试剂有限公司; 限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I, 预染蛋白 Marker, 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 均购于 Fermentas 公司; Solution I 连接酶, Taq DNA 聚合酶, DL10000 DNA Marker 均购于 Takara 公司; 质粒提取试剂盒购于北京擎科新业生物技术有限公司。

1.2 *S. sobrinus* 6715 菌悬液和 SEPT 的配制

将复苏 16~18 h 的 *S. sobrinus* 6715 接种到 TSB 培养基中, 37 °C 厌氧培养 16 h, 离心 (3200 g×10 min), 收集的菌体, 用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 洗涤 2~3 次, 调整菌液浓度为 OD₆₀₀=1.10 的菌悬液备用。用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 将 SEPT、NaF 配制成 7.8125、15.6150、31.2500、62.5000、125.0000、250.0000 和 500.0000 μg/mL 的溶液备用。

1.3 SHA 的制备

口腔健康成年人进食 3 h 后, 清水漱口, 收集全唾液, 4 °C 离心 (12000 g×20 min), 收集上清液。准确称取 5.0 mg 羟基磷灰石于 96 孔板中, 加 200 μL、0.01 mol/L PBS 浸泡一夜, 除去上清液, 每孔加 200 μL 唾液上清液, 37 °C 摇床震荡 1 h, 每孔加 200 μL、0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次除去未包被在羟基磷灰石表面的唾液, 得到 SHA。

$$\text{粘附抑制率}/\%=(1-\text{实验组荧光值}/\text{空白组荧光值})\times 100\% \quad (1)$$

1.4 SEPT 处理唾液获得性膜干预 *S. sobrinus*

6715 在 SHA 的粘附

将荧光染料 BECEF/AM 稀释后加入 *S. sobrinus* 6715 菌悬液, 使染料浓度为 0.01 mmol/L, 37 °C 标记 2 h, 离心后, 用 0.01 mol/L PBS 清洗并重新悬浮标记的菌体; 向装有 SHA 的 96 孔板中加入不同浓度的 SEPT 和阳性对照 NaF 200 μL, 空白对照组用 0.01 mol/L PBS 代替, 37 °C 轻微震动 1 h 后, 用 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次除去药物残留, 沉淀即为药物处理后的 SHA; 每孔再加入 200 μL 荧光标记的 *S. sobrinus* 6715 菌悬液, 37 °C 轻微震动 1.5 h, 完成体外粘附过程, 用 0.01 mol/L PBS 轻轻洗涤 2 次, 除去未被结合和结合不紧密的菌体, 用 F-4600 荧光分光光度计(日本, Hitachi)测定空白组和实验组荧光值, 激发波长 488 nm, 发射波长 535 nm, 狭缝宽度 5 nm, 计算 SEPT 对 *S. sobrinus* 6715 粘附抑制率, 计算公式如上式(1)。

1.5 SEPT 处理 *S. sobrinus* 6715 干预其在 SHA

的粘附

将 *S. sobrinus* 6715 菌悬液与不同浓度的 SEPT 和阳性对照 NaF 分别按体积比 1:1 混合, 以 PBS 作为空白对照组, 37 °C 作用 1 h 后离心, 用 0.01 mol/L PBS 清洗并将菌体重悬, 即为处理后的菌液; 将荧光染料 BECEF/AM 稀释后加入菌悬液, 标记 2 h 后离心, PBS 清洗并重新悬浮标记的菌体; 向装有 SHA 的 96 孔板中加入经不同浓度 SEPT、NaF 和 PBS 处理后的菌悬液, 37 °C 轻微震动 1.5 h, 完成体外粘附过程, 离心, PBS 洗涤 2 次, 用荧光分光光度计测定空白组和实验组荧光值, 按照 1.4 中公式(1)计算对 *S. sobrinus* 6715 的粘附抑制率。

1.6 *S. sobrinus* 6715 的 GTF-I/CAT 制备

1.6.1 GTF-I 的 CAT 区的克隆和表达

根据文献^[7,12], 设计上游引物 5'ATAGAATTCGAC GGAAAACTTGGACAGAATCTG3', 下游引物 5'ATAGTTCGACTTAAAGAAAGCGGCACATTGTAGT GAGT3'; 在上、下游引物中分别引入 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切位点, 及其相应的保护碱基(斜体为保护碱基, 下划线为酶切位点)。将 *S. sobrinus* 6715 沸水煮 10 min, 然后冰上放置 10 min, 以此为模板, 利用上下游引物进行 PCR 扩增, 用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切 PCR 产物和

Pgex-4T-1 载体, 再用 Solution I 将双酶切后的 PCR 产物与 Pgex-4T-1 载体连接, 得到重组质粒 Pgex-4T-1-GTF-I/CAT, 并转化至感受态细胞大肠杆菌 DH5α 中, 然后均匀涂布到含有氨苄抗性的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜, 次日挑取单克隆, 利用上下游引物进行 PCR 鉴定阳性克隆, 并任选一个阳性克隆进行测序; 再将构建的重组质粒 Pgex-4T-1-GTF-I/CAT 转化至大肠杆菌 T7 Express competent *E. coli* (High Efficiency), 加入 1 nmol/L IPTG 诱导表达后离心 (12000 g×30 s) 收集菌体, 超声破碎仪破碎菌体, 再离心 (12000 g×10 min), 分别收集裂解菌体的沉淀和上清液, 分别对其进行 SDS-PAGE 检测; 将超声后的裂解菌体的上清液与谷胱甘肽巯基转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 纯化树脂结合, 0.02 mol/L PBS 洗 3 遍, 用含有还原性谷胱甘肽的溶液洗脱目标蛋白, 收集洗脱后的溶液, 超滤浓缩, 得到目标蛋白。

1.6.2 GTF-I/CAT 酶活和产多糖能力的测定

取 250 μL GTF-I/CAT, 250 μL、0.5 mol/L 蔗糖的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, 0.5 mg 葡聚糖 T10, 37 °C 下反应 16 h, 沸水浴终止反应, 离心, 分别收集上清液和沉淀备用。

Nelson-Somogyi 法测定 GTF-I/CAT 的酶活: 首先用葡萄糖配制标准溶液, 制作葡萄糖标准曲线。将收集的上清液加 0.5 mL 双蒸水, 混合均匀, 再加 1 mL Nelson-Somogyi A 液, 沸水浴条件下加热反应 10 min, 流水冷却, 再加入 1 mL Nelson-Somogyi B 液和 9.5 mL 双蒸水, 混合均匀反应完成后在 620 nm 测量 OD 值, 根据葡萄糖标准曲线, 计算 GTF-I/CAT 的酶活。

蒽酮硫酸法测 GTF-I/CAT 产多糖能力: 首先用葡聚糖 2 万配制标准溶液, 制作多糖标准曲线。将收集的沉淀加 1 mL 无水乙醇, 4 °C 冰箱放置一夜后, 离心 (12000 g×20 min) 得到多糖沉淀, 用 20 μL、0.5 mol/L NaOH 溶液溶解, 加 80 μL 双蒸水稀释, 再加 150 μL 蒽酮硫酸, 反应完成后在 630 nm 测量 OD 值, 根据多糖标准曲线, 得出多糖含量, 计算 GTF-I/CAT 的产多糖能力。

1.7 SEPT 对 GTF-I/CAT 产 WIG 的影响

取 250 μL GTF-I/CAT, 250 μL、0.5 mol/L 蔗糖磷酸盐缓冲液, 0.5 mg 葡聚糖 T10, 以及不同浓度的 SEPT 溶液 (62.25、125、250 和 500 μg/mL) 50 μL, 空白对照加 50 μL 双蒸水, 37 °C 下反应 24 h, 根据 WIG 产量变化, 评价 SEPT 对 GTF-I/CAT 活性的抑制, 涡旋混合器将产生的 WIG 悬浮均匀, 测 550 nm 的

OD 值, 计算经不同浓度 SEPT 作用后 GTF-I/CAT 产 WIG 的相对酶活性, 计算公式如下式(2)。

$$\text{相对酶活性}(\%) = (\text{实验组 OD 值} / \text{空白 OD 值}) \times 100\% \quad (2)$$

1.8 数据统计分析

采用 SPSS 17.0 统计软件, 对实验数据进行单因素方差分析的 Dunnett 双侧检验, 比较各实验组数据与对照组数据间的显著性差异; 当 $p < 0.05$ 时, 实验组与对照组具有显著性差异, 当 $p < 0.01$ 时, 实验组与对照组具有极显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 SEPT 处理唾液获得性膜干预 *S. sobrinus*

6715 在 SHA 的粘附

用不同浓度的 NaF 和 SEPT 处理 SHA 上的唾液获得性膜, 再将荧光标记的 *S. sobrinus* 6715 粘附到唾液获得性膜上, 根据荧光值的大小计算样品对唾液获得性膜的抑制率, 结果见图 1。

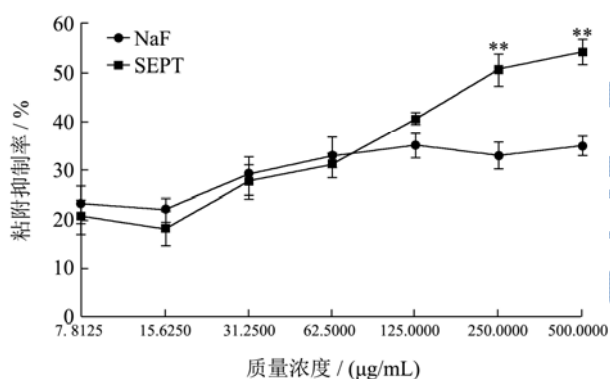


图 1 不同样品处理唾液获得性膜干预 *S. sobrinus* 6715 粘附的抑制率

Fig.1 Inhibition of *S. sobrinus* 6715 adherence to SHA by acquired salivary pellicle treated with different bioactive constituents

注: **表示与阳性对照 NaF 相比, 具有极显著性差异。

结果表明, NaF 和 SEPT 处理唾液获得性膜后, 都能抑制 *S. sobrinus* 6715 在 SHA 上的粘附, 抑制效果随着浓度的增高而增大, 其中 SEPT 的浓度效应关系强于阳性对照 NaF; 当 SEPT 浓度较低时 ($\leq 62.5 \mu\text{g/mL}$) 时, SEPT 的抑制效果与 NaF 相当, 但当浓度 $\geq 125 \mu\text{g/mL}$ 时, SEPT 的抑制效果明显强于 NaF, 浓度为 250、500 $\mu\text{g/mL}$ 时, SEPT 的抑制效果与阳性

对照 NaF 相比, 具有极显著差异 ($p < 0.01$)。

2.2 SEPT 处理 *S. sobrinus* 6715 干预其在 SHA 的粘附

用不同浓度的 NaF 和 SEPT 处理 *S. sobrinus* 6715 菌体, 菌体被荧光标记后粘附到 SHA 的唾液获得性膜上, 根据荧光值计算 NaF 和 SEPT 对细菌的抑制率, 结果见图 2。经 NaF 和 SEPT 处理后, *S. sobrinus* 6715 在 SHA 的粘附明显降低, 抑制效果都随着 NaF 和 SEPT 浓度的增大而增大, 然后呈现平缓的趋势; 不同浓度 SEPT 的抑制效果强于阳性对照 NaF, 与 NaF 相比都具有极显著性差异 ($p < 0.01$), 抑制率在 50~70% 之间。

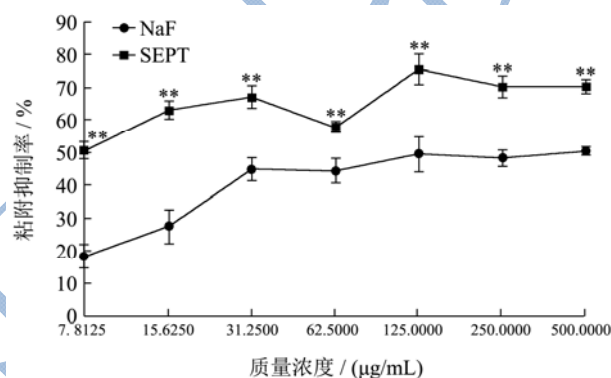


图 2 不同样品处理细菌干预 *S. sobrinus* 6715 粘附的抑制率
Fig.2 Inhibition of *S. sobrinus* 6715 adherence to SHA following the treatment with different bioactive constituents

注: **表示与阳性对照 NaF 相比, 具有极显著性差异。

初始粘附是细菌表面粘结素蛋白通过静电引力、疏水作用、氢键作用等不可逆的粘附到牙齿表面, 接着粘结素与唾液获得性膜中的受体成分结合完成致龋菌在牙齿表面的初始粘附^[13]。用样品分别处理唾液获得性膜表面和处理细菌, 是因为样品通过与获得性膜表面受体蛋白以及菌表面粘结素蛋白发生结合或反应, 减少结合位点, 从而影响细菌在 SHA 上的粘附。实验结果表明, SEPT 可以抑制 *S. sobrinus* 6715 在 SHA 上的初始粘附, SEPT 作用于菌干预其在 SHA 上的粘附抑制率为 50~70%, 而作用于唾液获得性膜干预菌在 SHA 上的粘附抑制率小于 50%, 处理细菌比处理唾液获得性膜的抑制效果更明显, 这与黄曼^[2]的结果相符, 推断 SEPT 可以作用 *S. sobrinus* 6715 表面粘结素和唾液获得性膜中的蛋白受体, 并以影响 *S. sobrinus* 6715 表面粘结素为主, 使二者的结合受阻, 从而抑制 *S. sobrinus* 6715 的初始粘附。

2.3 *S. sobrinus* 6715 GTF-I 的 CAT 区蛋白的制

备

2.3.1 GTF-I/CAT 的克隆和表达

编码 *S. sobrinus* 6715 的 GTF-I 基因全长 5.1 kb, 位于 GTF-I 氨基端 1/3 处的 CAT 区是 GTF-I 重要功能区, 可以通过基因工程的方法获得。

将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 3, 图中显示 PCR 产物在 1000 bp 附近, 与理论上 1104 bp 大小相符, 可以按照试剂盒说明书对 PCR 产物进行回收。

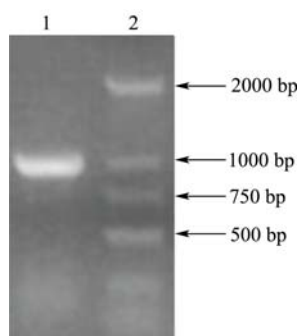


图 3 *S. sobrinus* 6715 GAT 基因 PCR 扩增产物

Fig.3 PCR product of *S. sobrinus* 6715 catalytic region

注: 1 表示 PCR 产物; 2 表示 DNA Marker, DL2000。

用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切重组质粒 Pgex-4T-1-GTF/CAT, 得到两条条带, 分子量分别为 4969 bp 的 Pgex-4T-1 载体和分子量为 1104 bp 的目标片段, 结果见图 4, 说明成功构建了 Pgex-4T-1-GTF/CAT 重组质粒。

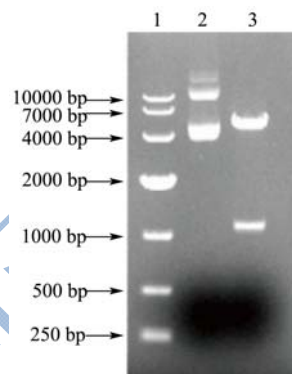


图 4 重组质粒酶切鉴定图

Fig.4 Restriction enzyme digestion of the recombinant Pgex-4T-1-GTF/CAT plasmid

注: 1 表示 DL10000; 2 表示 Pgex-4T-1-GTF/CAT; 3 表示双酶切后的 Pgex-4T-1-GTF/CAT。

将重组质粒 Pgex-4T-1-GTF-I/CAT 转化至感受态细胞, 挑取单克隆, 利用上下游引物进行菌落 PCR 鉴定阳性克隆, 任选一个阳性克隆送测序, 将测序后的序列结果与 NCBI 上的序列比对, 有 9 个碱基不一致, 相似性为 99%, 9 个碱基的不同不影响编码的氨基酸。

将重组质粒 Pgex-4T-1-GTF-I/CAT 转入大肠杆菌 T7 Express competent *E.coli* (High Efficiency), 经 1 nmol/L IPTG 诱导, 重组蛋白的表达结果如图 5 所示, 编号 3~6 为不同表达条件下裂解菌体后所得上清液电泳条带图, 编号 7~10 为不同表达条件下裂解菌体后所得沉淀的电泳条带图, 由图可知, GTF-I 的 CAT 蛋白可以在上清液里表达, 在 37 °C, IPTG 诱导 4 h 的条件下, GTF-I 的 CAT 蛋白在上清液中表达显著, 由此说明, 我们获得了高表达量的可溶性融合蛋白, 蛋白命名为 GTF-I/CAT, 分子量约为 68 ku。

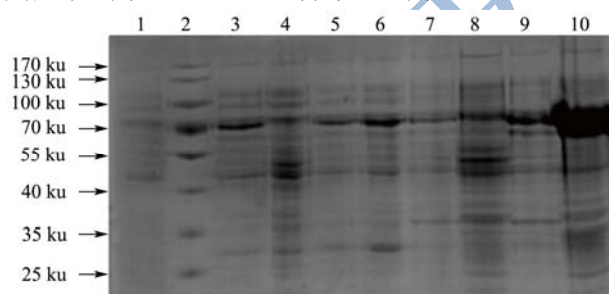


图 5 GTF-I/CAT 的 SDS-PAGE

Fig.5 SDS-PAGE analysis of the recombinant GTF-I/CAT proteins

注: 1 表示未用 IPTG 诱导; 2 表示蛋白质 Marker; 3~10 表示实验组。

诱导表达的 GTF-I/CAT 蛋白经 GST 琼脂糖凝胶树脂纯化后, 进行超滤浓缩, 结果如图 6, 图中显示蛋白的大小为 68 ku(其中 GTF-I 的 CAT 大小为 42 ku, GST 蛋白大小为 26 ku), 与预期目标产物分子量相近。

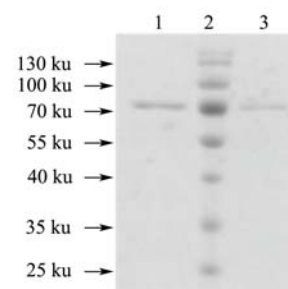


图 6 GTF-I/CAT 纯化浓缩图

Fig.6 SDS-PAGE analysis of the purified and concentrated GTF-I/CAT

注: 1 表示上样量 1 μg; 2 表示蛋白质 Marker; 3 表示上样量 0.7 μg。

2.3.2 GTF-I/CAT 酶活和产多糖能力

GTF-I 的 GAT 能够水解蔗糖并将其中的葡萄糖基转移至已存在的葡聚糖链上, 进一步生成 WIG, 其化学方程式为: $C_{12}H_{22}O_{11} + (C_6H_{10}O_5)_n \rightarrow C_6H_{12}O_6 + (C_6H_{10}O_5)_{n+1}$ [7,8]。GTF-I/CAT 与蔗糖溶液反应 16 h 后, 反应液明显变浑浊, 有 WIG 的产生。通过 Neson-Somogyi 法测得 GTF-I/CAT 的酶活为 8.446 mIU, 通

过葱酮硫酸法测定 GTF-I/CAT 产多糖的能力为 1.603 mg/(mg·h), 说明通过体外合成的方式, 成功获得了可溶的 *S. sobrinus* 6715 GTF-I 的 CAT 区, 这一区域可以分解蔗糖产生 WIG。GTF-I/CAT 的酶活略高于传统硫酸铵盐沉淀法获得的 GTF 粗酶酶活 6.71 mIU^[14], GTF-I 基因全长 5.1 kb, 未表达区域对 GTF-I 的催化活性也有重要影响, 羧基端重复序列能够有效提高氨基端 CAT 区葡糖基转移能力从而提高 WIG 的整体合成水平^[8], 这可能是 GTF-I/CAT 的酶活力未能显著提高的原因之一, 但相比于硫酸铵盐沉淀法获得的成分复杂、纯度低的 GTF 粗酶, 基因克隆表达 GTF-I/CAT 成分明确, 纯度高, 更适合作为防龋研究材料。

2.4 SEPT 对 GTF-I/CAT 产 WIG 的影响

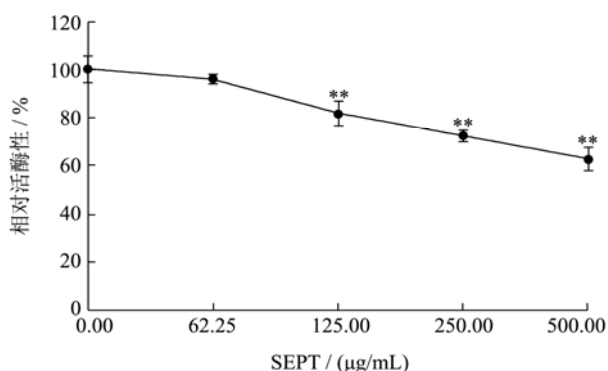


图7 不同浓度 SEPT 处理后 GTF-I/CAT 相对酶活性

Fig.7 Effect of SEPT on the relative enzyme activity of GTF-I/CAT

注: **表示与空白对照相比, 具有极显著性差异。

经不同浓度 SEPT 处理后, 反应体系的 OD 值都降低, 说明产生的 WIG 减少, 结果如图 7 所示。统计学分析表明, 4 种浓度的 SEPT 都能抑制 GTF-I/CAT 产生 WIG, 抑制效果随着 SEPT 浓度的增大而增大, 具有一定的浓度效应关系, 当 SEPT 浓度大于 125 μg/mL, 实验组与对照组比较差异极显著 ($p < 0.01$), 能使 *S. sobrinus* 6715 GTF-I/CAT 酶活性显著降低。

许多研究都表明, 抗龋成分可以抑制 GTF 活性, 减少 WIG 的产生, 从而抑制致龋菌的粘附聚集过程, 但抑制机理并不清楚^[4,5]。我们通过将 GTF-I 的 CAT 单独合成出来, 用 SEPT 直接作用其 CAT, 结果表明 SEPT 可以通过抑制 GTF-I 的 CAT 活性, 减少 WIG 产生, 从而干预致龋菌在牙齿表面进一步的粘附聚集。GTF-I 的 CAT 含有蔗糖的结合位点, 具有催化水解蔗糖的功能, 其活性的大小与 CAT 区结构的稳定性有关。而 SEPT 属于植物多酚, 易与蛋白质结合, 推测可能是 SEPT 与 GTF-I 的 CAT 相结合, 改变 CAT 的结构和性质, 破坏了其空间结构, 使其催化功能被抑

制, 从而抑制其产生 WIG。

3 结论

SEPT 可以通过作用于 *S. sobrinus* 6715 菌体和唾液获得性膜 2 种途径, 减少 *S. sobrinus* 6715 在 SHA 上的粘附, 对 *S. sobrinus* 6715 的初始粘附产生抑制, 但作用于菌体 *S. sobrinus* 6715 的抑制效果更明显。通过基因工程重组表达的方法获得了具有生物活性的 *S. sobrinus* 6715 GTF-I/CAT 蛋白, 其酶活为 8.446 mIU, 产多糖能力为 1.603 mg/(mg·h); SEPT 可以抑制 GTF-I/CAT 产生 WIS, 说明 SEPT 可以直接作用 GTF-I 的 CAT 区, 抑制其功能的发挥。本实验表明 SEPT 既可以抑制 *S. sobrinus* 6715 的初始粘附, 又可以抑制蔗糖依赖性粘附过程中致龋毒理因子 GTF-I 的活性, 导致 WIG 产量降低, 干预 *S. sobrinus* 6715 在牙齿表面的粘附聚集, 从而干预龋齿的发生。

参考文献

- [1] 孙静华. 胃癌前病变患者口腔中龋病和牙周病相关细菌以及口腔细菌多样性的研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2011
SUN Jing-hua. Dental caries and periodontal disease associated bacterial colonization and bacterial diversity in individuals with gastric precancerous lesions [D]. Wuhan: Wuhan University, 2011
- [2] 黄曼. 原花青素四聚体干预变形链球菌血清型 c 体外粘附途径及机理研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013
HUANG Man. *In vitro* of effect and mechanism of proanthocyanidins tetramers intervene *S. mutans* *Ingbritt*(c) in adherent pathway [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013
- [3] Halpin R M, Brady D B, Riordan E D, et al. The effect of untreated and enzyme-treated commercial dairy powders on the growth and adhesion of *Streptococcus mutans* [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2011, 44: 1525-1532
- [4] Sentila R, Karthika S, Michael A, et al. Protection against dental caries by passive immunization with hen egg yolk antibody using cell associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* [J]. *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis*, 2013, 2(3): 1-5
- [5] Sadaf H, Mohd D, Asad U. Inhibitory effect of *zingiber officinale* toward *Streptococcus mutans* virulence and caries development: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *BMC Microbiology*, 2015, 15(1): 1-14
- [6] Noriko S K, Teruaki S, Mitsuo H, et al. Expression of the *gtfI* gene from *Streptococcus anginosus* using integration-

- mediated transformation system [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1722: 189-199
- [7] Hirokazu A, Tomohiro M, Takao K, et al. Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water-insoluble glucan synthetase) [J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(3): 989-996
- [8] Norifumi K, Yasuhiro T, Tatsuo Y, et al. Structure and enzymatic properties of genetically truncated forms of the water-insoluble glucan-synthesizing glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus* [J]. *Biochemical Journal*, 1999, 126(2): 287-295
- [9] 玉佳男.高粱原花青素四聚体与变形链球菌血清型 c 致龋毒力因子作用的光谱学研究[D].武汉:华中农业大学,2015
YU Jia-nan. Spectroscopic study on the interactions between sorghum procyanidins tetramers and the virulence factors of *Streptococcus mutans* serotype c [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015
- [10] 汪林.变形链球菌葡糖基转移酶催化活性区基因的分子克隆,表达及活性测定[D].北京:中国人民解放军军医进修学院,2007
WANG Lin. The recombinant expression and activities assay of catalytic region of glucosyltransferase [D]. Beijing: China PLA General Hospital Military Postgrad Medical College, 2007
- [11] Xu Li-man, Liu Rui, Li Duan-dan, et al. An *in vitro* study on the dental caries preventing effect of oligomeric procyanidins in *Sorghum episperma* [J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(3): 911-916
- [12] 王启要,陈红兵,许杨.远缘链球菌中葡萄糖基转移酶催化活性区基因的克隆和初步表达[J].实用口腔医学杂志,2004, 20(3):266-269
WANG Qi-yao, CHEN Hong-bing, XU Yang. Cloning and expression of gene encoding catalytic region of glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus* 6715 [J]. *Journal of Practical Stomatology*, 2004, 20(3): 266-269
- [13] 黄瑞哲,田剑刚,种燕,等.不同浓度硒对变形链球菌粘附功能的影响[J].临床口腔医学杂志,2011,27(3):136-138
HUANG Rui-zhe, TIAN Jian-gang, ZHONG Yan, et al. Effect of selenium on the adhesion function of *Streptococcus mutans* [J]. *Journal of Clinical Stomatology*, 2011, 27(3): 136-138
- [14] 史艳芬,张向宇,韩慧,等.柠檬精油对表兄链球菌致毒力因子的影响[J].中华口腔医学杂志,2012,47(12):739-742
SHI Yan-fen, ZHANG Xiang-yu, HAN Hui, et al. Effect of lemon essential oil on caries factors of *Streptococcus sobrinus* [J]. *Chinese Journal of Stomatology*, 2012, 47(12): 739-742