

# 变形链球菌 UA159 葡萄糖基转移酶 B 催化活性区的基因克隆及表达

玉佳男<sup>1</sup>, 田晶<sup>1</sup>, 李宝丽<sup>1</sup>, 张永霞<sup>2</sup>, 刘睿<sup>1</sup>

(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:** 为获得具有良好生物活性的可溶性葡萄糖基转移酶催化活性区(GTFB/CAT), 根据 NCBI 上已发表的 *Streptococcus mutans* UA159 (血清型 c) GTFB 的 DNA 测序结果, 按照 GTFB/CAT 两端的序列设计引物, 利用 PCR 克隆技术钓取 *S. mutans* UA159 (血清型 c) 的 GTFB/CAT 基因, 连入表达载体 pET-28b(+) 中构成 pET-28b(+)-GTFB/CAT 重组体, 将重组载体转入大肠杆菌 BL21(*E. coli* BL21) 宿主菌中进行诱导表达, 最佳诱导条件为 37 °C 或 30 °C、4 h、诱导剂 IPTG 的浓度为 1 mmol/L, 产物经 Ni<sup>2+</sup>-NAT 树脂亲和层析纯化, 得到了不可溶的 GTFB/CAT 包涵体, 包涵体通过变性-复性最终得到可溶性蛋白, 产物经 SDS-PAGE 分析表明, 在 44 ku 处有一明显条带, 与预期蛋白分子量一致, 蛋白纯度约为 80%, 采用 Somogyi 法测得 GTFB/CAT 蛋白的比酶活为 1.66 IU/mg。研究表明: 成功克隆 GTFB/CAT 基因并通过在 *E. coli* BL21 原核体系中表达得到有生物活性的可溶性蛋白, 为后续研究 GTF 的抗结剂及预防龋齿的效果及机理奠定了基础。

**关键词:** 变形链球菌 UA159 (血清型 c); 葡萄糖基转移酶催化活性区; 基因表达; 克隆; 比酶活

文章编号: 1673-9078(2015)5-71-75

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.012

## Gene Cloning and Expression of the Catalytic Region of Glycosyltransferase B from *Streptococcus mutans* UA159

YU Jia-nan<sup>1</sup>, TIAN Jing<sup>1</sup>, LI Bao-li<sup>1</sup>, ZHANG Yong-xia<sup>2</sup>, LIU Rui<sup>1</sup>

(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:** Water-soluble, catalytic region of glycosyltransferase B (GTFB/CAT) with good bioactivity, was obtained from *Streptococcus mutans* UA159 (*Ingbritt c*). The primers were designed based on the conservative sequences of GTFB gene in *S. mutans* UA159 (*Ingbritt c*), as listed in the National Center for Biotechnology Information database and the sequences at the ends of GTFB/CAT. The GTFB/CAT gene was amplified by polymerase chain reaction from *S. mutans* UA159 (*Ingbritt c*) and then cloned into vector pET-28b(+) to construct the recombinant pET-28b(+)-GTFB/CAT, which was then transformed into *Escherichia coli* BL21. Optimal induction conditions were as follows: temperature at 37 °C or 30 °C; time for 4 h; 1 mmol/L of IPTG for induction. The product was purified by Ni<sup>2+</sup>-NAT resin-affinity chromatography and insoluble inclusion body GTFB/CAT was obtained. Subsequent denaturing and refolding produced the water-soluble protein. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis revealed a clear band at 44 ku, which is consistent with the expected molecular weight, and the purity of protein was approximately 80%. The specific activity of the protein was found to be 1.66 IU/mg by the Somogyi method. The results indicated that water-soluble proteins with biological activity were obtained through the expression of cloned GTFB/CAT gene in *Escherichia coli* BL21. This will lay a basis on further study of GTF antagonists and their effect as well as mechanism of action in prevention of dental caries.

**Key words:** *Streptococcus mutans* UA159 (*Ingbritt c*); catalytic region of glycosyltransferases B; gene expression; cloning; specific activity

收稿日期: 2014-08-29

基金项目: 国家自然科学基金 (31271939)

作者简介: 玉佳男 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为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: 天然产物化学

龋齿是影响我国居民口腔健康的重要问题之一, 变形链球菌 (*Streptococcus mutans*, *S. mutans*) 是诱发龋齿的主要致病菌之一, 通过粘附在牙齿表面并代谢口腔中的碳水化合物产酸, 导致牙齿脱矿, 最终形成龋洞。葡萄糖基转移酶 (glucosyltransferases, GTF)

是由 *S.mutans* 代谢产生的最重要的致龋因子之一, 由其催化产生的水不溶性葡聚糖能够促进致龋齿菌与牙齿表面的粘附, 从而形成菌斑<sup>[1]</sup>。GTF 在 *S.mutans* 血清型 c 中主要分为三种, 分别是 GTFB、GTFD 和 GTFC。其中 GTFB 催化合成水不溶性葡聚糖, GTFD 合成水溶性葡聚糖, GTFC 合成水不溶性和水溶性葡聚糖的混合物。编码 GTFB 的基因全长约为 4.8 kb, 含有三个功能区段, 其中位于 N 端的催化活性区 (catalytic region, CAT) 是重要的功能区段, 具有催化蔗糖水解的活性, 能够催化蔗糖产生葡聚糖<sup>[2]</sup>。

致龋齿菌在牙面粘附和定居是龋齿发生的关键, 而变形链球菌代谢过程中产生的 GTF 对这一过程起主要作用。如何抑制 GTF 的催化活性是研究并阐明天然产物中活性成分干预龋齿发生机制的重要途径之一和研究热点<sup>[3-5]</sup>。为了获得 GTF 蛋白作为研究材料, 早期研究一般采用硫酸铵盐析法对细胞裂解物或发酵液进行沉淀, 然后再采用多种层析法进一步分离和纯化。进一步研究发现 GTF 能与葡聚糖或右旋糖苷结合, 表现出特异的亲和性, 亲和层析被广泛用于 GTF 的进一步富集、分离和纯化, 但此类方法步骤繁琐, 且蛋白成分复杂, 获得大量单一 GTF 组分比较困难<sup>[6-7]</sup>。因此近年来, 很多学者开始尝试用基因工程的方法来表达其编码基因并获得高纯度和高生物活性的 GTF<sup>[2, 8]</sup>。本研究通过利用 PCR 克隆技术克隆 *S.mutans* UA159 (血清型 c) 的 GTFB 催化活性区 CAT 基因, 并连入表达载体 pET-28b(+), 将重组体 pET-28b(+)-GTFB/CAT 转入 *E.coli* BL21 宿主菌中进行诱导表达, 得到的融合蛋白经过纯化、变性-复性后, 采用 Somogyi 法测定其活性, 旨在为研究并揭示天然活性多酚通过干预 GTF 生物活性而预防龋齿发生机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种与质粒

*S.mutans* UA159 (血清型 c) 由武汉大学口腔医院提供; 质粒 pET-28b(+), *E. coli* BL21 均由普健生物(武汉)科技有限公司保藏并提供。

#### 1.1.2 培养基

LB培养基 (1 L): 胰蛋白胨10 g, 酵母抽提物5 g, NaCl 10 g, 琼脂15 g, 根据需要添加50 mg/mL卡那霉素, 终浓度为100 mg/mL。

TSA培养基 (1 L): 大豆蛋白胨3 g, 胰蛋白胨17 g, NaCl 5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, 葡萄糖2.5 g, 琼脂15 g,

pH=7.3±0.2。

TSB培养基 (1 L): 大豆蛋白胨3 g, 胰蛋白胨17 g, NaCl 5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, 葡萄糖2.5 g, 琼脂15 g, pH=7.3±0.2。

#### 1.1.3 主要酶类和生化试剂

限制性内切酶 *Nco* I 和 *Xho* I, IPTG, 预染蛋白 Marker 均购自 Fermentas 公司, Taq DNA 聚合酶, Solution 1 连接酶和 DL10000 DNA Marker 均为 Takara 公司产品, 琼脂糖凝胶DNA纯化回收试剂盒由 Omega 公司提供, 质粒提取试剂盒购于北京擎科新业生物技术有限公司, 其他试剂均为市售国产分析纯。

## 1.2 方法

### 1.2.1 *S.mutans* UA159 (血清型 c) 的培养

将 *S.mutans* UA159 (血清型 c) 划线接种于 TSA 固体培养基, 37 °C 倒置培养 24 h 后, 挑取单个菌落接种于 TSB 液体培养基中, 37 °C 厌氧培养 24 h, 4500 r/min 离心 5 min, 10 mL PBS 缓冲液清洗沉淀两次, 收集菌体沉淀, 待用。

### 1.2.2 PCR 引物的设计

根据 NCBI 公布的 *S.mutans* UA159 (血清型 c) 的 GTFB (Gene ID: 1028336) 的 DNA 测序结果, 按照 GTFB 催化活性区 CAT 两端的序列设计引物, 在上游引入 *Nco* I 酶切位点, 在下游引入 *Xho* I 酶切位点及其相应的保护碱基<sup>[8]</sup>。

上游引物: 5'GCGCCATGGGCATGAAAAAAG AATTTTATCAGCAGTTTTAGTG 3'

下游引物: 5'GCGCTCGAGGTTTGGATAGATA TAGCTTACTACTGGATTA<sup>3'</sup>

(斜体表示保护碱基, 横线部分表示酶切位点)

### 1.2.3 GTFB/CAT 的克隆

以煮沸的 *S.mutans* UA159 (血清型c) 为模版, 以合成的GTFB/CAT上下游引物进行PCR扩增。PCR反应体系: dNTP (2.5 mmol/L) 0.8 μL, 10×Taq酶缓冲液2.5 μL, 上游引物 (10 pmol/μL) 0.5 μL, 下游引物 (10 pmol/μL) 0.5 μL, 模板DNA 1 μL, Taq DNA聚合酶0.2 μL, 加无菌水19.3 μL使总体积为25 μL。PCR反应条件: 94 °C预变性10 min, 94 °C变性45 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸90 s, 扩增30个循环, 72 °C末轮延伸10 min。PCR反应产物在1%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像分析系统下观察结果并照相。

### 1.2.4 PCR 产物与载体 pET-28b(+) 连接

PCR 产物用 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切, 酶切体系为: PCR 产物 30 μL, *Nco* I 2 μL, *Xho* I 2 μL, 10×buffer 5 μL, 加无菌水 19.3 μL 使总体积为 50 μL。37 °C 酶切 3



*S.mutans*UA159 (血清型 c) 中的 GTFB/CAT 基因克隆出来。所得序列与 NCBI 上公布序列比对结果如图 2 所示: Score=2078bits(1125), Expect=0.0, Identities=1127/1128(98%), Gaps=0/1128(0%), Strand= Plus/Plus。

### 2.3 pET-28b(+)-GTFB/CAT 重组质粒双酶切鉴定

用 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切 pET-28b(+)-GTFB/CAT 结构, 得到一条带, 分子量大的 (5368 bp) 为 pET-28b(+) 载体, 分子量小 (1163 bp) 的为目标片段 (图 3), 表明目标基因成功连入 pET-28b(+) 载体, 且成功构建了 pET-28b(+)-GTFB/CAT 重组质粒。

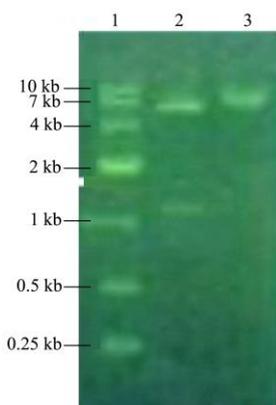


图 3 重组质粒酶切鉴定图

Fig.3 PCR result for enzymatically digested recombinant plasmid

注: 1: DL10000 DNA Marker; 2: 酶切后 pET-28b (+)-GTFB/CAT 产物; 3: 重组 pET-28b (+)-GTFB/CAT。

### 2.4 重组质粒 pET28b(+)-GTFB/CAT 在 *E.coli*

#### BL21 中的诱导表达

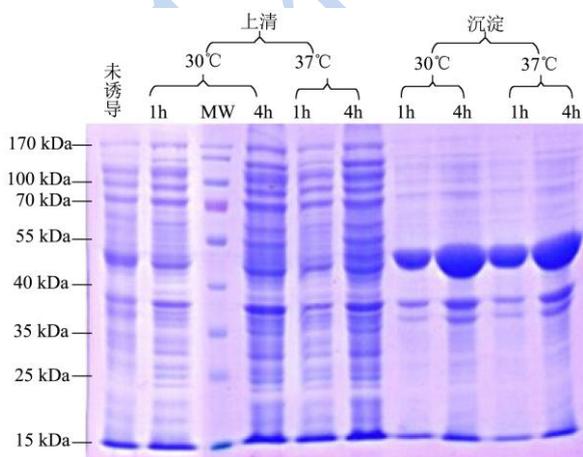


图 4 GTFB/CAT 的表达结果

Fig.4 GTFB/CAT expression analyzed by PCR

将诱导表达得到的蛋白上清和沉淀分别经

SDS-PAGE 分析, 如图 4, GTFB/CAT 在 37 °C 和 30 °C, 诱导 4 h 在 BL21 中表达效果明显优于诱导 1 h 表达效果, GTFB/CAT 蛋白的分子量约为 44 KD, 与 NCBI 上查到的 GTFB/CAT 理论分子量接近, 但是表达的蛋白都在沉淀中以包涵体的形式存在而不可溶, 上清液中则无表达。包涵体形成的原因很多, 可能是外源蛋白在细胞内表达时由于速度过快而没有时间正确折叠, 也有可能因为培养条件不适宜等造成<sup>[10]</sup>。

### 2.5 GTFB/CAT 包涵体蛋白的纯化及复性

由于包涵体蛋白绝大多数是不可溶的且生物活性较低, 这对于后续研究 GTFB/CAT 在龋齿发生机制中的作用造成了困难, 据文献报道, 包涵体蛋白质经过变性-复性这一过程可以恢复生物活性。低浓度的尿素作为常用的离液剂, 可以破坏蛋白间的氢键使其增溶, 最终经过透析可恢复蛋白的生物活性<sup>[11-13]</sup>。GTFB/CAT 包涵体蛋白经 Ni<sup>2+</sup>-NAT 树脂纯化后, 再经尿素变性-复性, 得到了可溶性蛋白。蛋白产物经 SDS-PAGE 分析, 如图 5 所示, 在 44KD 左右处有一明显条带, 与 GTFB/CAT 理论分子量接近, 蛋白纯度约为 80%, 复性后蛋白的表达量为 2 mg/L。

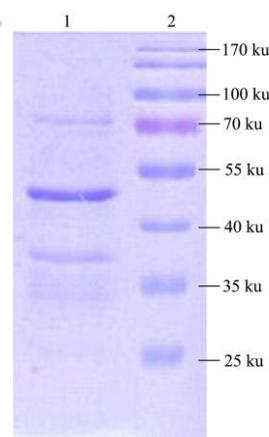


图 5 SDS-PAGE 分析复性后的 GTFB/CAT 蛋白

Fig.5 SDS-PAGE of GTFB/CAT protein after refolding

注: 1: GTFB/CAT 蛋白; 2: 预染蛋白 Marker。

### 2.6 GTFB 活力的测定结果

实验组与空白组消耗的 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 体积差平均值为 12.5 mL, 查对应的 Somogy 法还原糖 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 相当量表对应的还原糖为 1.422 mg, 计算酶活为 131.67 mIU, 比酶活为 1.66 IU/mg。这一结果优于采用传统方法从 *S.mutans* MT8148(血清型 c) 细胞裂解液中获得 GTFB 的酶活 2.604 mIU 和比酶活 25.3 mIU/mg<sup>[6]</sup>, 说明本研究通过基因克隆并在 *E.coil* BL21 诱导表达得到的 GTFB/CAT 具有催化蔗糖水解产生葡聚糖的活性且纯

度较高。

### 3 结论

本文通过 PCR 克隆技术成功钓取 *S.mutans* UA159 (血清型 c) 的 GTFB/CAT 基因, 连入表达载体 pET-28b(+), 并在 *E.coli* BL21 宿主菌中进行诱导表达, SDS-PAGE 分析表达产物表明蛋白全部以包涵体的形式存在于沉淀中, 实验采用离液剂尿素破坏蛋白间的氢键使其增溶, 再经过透析恢复蛋白活性。经过纯化、复性的 GTFB/CAT 蛋白纯度达到了 80% 左右, 采用 Somogy 法测定其酶活为 131.67 mIU, 比酶活为 1.66 IU/mg, 说明经过复性的 GTFB/CAT 具有催化蔗糖水解产生葡聚糖的酶活性。有学者在早期研究中通过分子克隆及表达从 *S.mutans* GS5 中分别得到了 GTFC 和 GTFB 两种粗蛋白的催化活性区, 并采用葱酮-硫酸法间接说明得到的蛋白具有酶活性, 同时实验中通过在表达载体上增加具有分子伴侣活性的外源蛋白, 最终得到了可溶性的目的蛋白<sup>[2,8]</sup>。具有分子伴侣活性的增溶标签虽然可以促进蛋白的可溶性表达, 但是多数标签分子量大, 成本高, 且因其影响因素较多而具有差异性<sup>[14]</sup>。本研究建立了通过基因克隆并在原核系统表达得到高纯度、高活性 GTF 的研究方法, 为后续进一步鉴定 GTF 并研究活性多酚对 GTF 的抑制作用机理打下基础。

### 参考文献

- [1] Sentila R, Karthika S, Michael A, et al. Protection against dental carries by passive immunization with hen egg yolk antibody using cell associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* [J]. Medical Microbiology and Diagnosis, 2013, 2(3): 1-5
- [2] 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
- [3] WANG Lin. The recombinant expression and activities assay of catalytic region of glucosyltransferas [D]. Beijing: The PLA Academy of Military Medical Education, 2007
- [4] Battagin J, Souza VT, Miyasaka NR, et al. Comparative study of the effect of green and roasted water extracts of mate (*Ilex paraguariensis*) on glucosyltransferase activity of *Streptococcus mutans* [J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2012, 27(2): 232-240
- [5] Zubaidah HAR, Nalina T. Scanning electron microscopic study of piper betle l. leaves extract effect against streptococcus mutans ATCC 25175 [J]. Journal of Applied Oral Science, 2011, 19(2): 137-146
- [6] Hayacibara MF, Koo H, Rosalen RL, et al. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2005, 101(1-3): 110-115
- [7] Yunagida A, Isozaki M, Shibusawa Y. Purification of glucosyltransferase from cell-lysate of *Streptococcus mutans* by counter-current chromatography using aqueous polymer two-phase system [J]. Journal of Chromatography B, 2004, 805(1): 155-160
- [8] 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
- [9] HUANG Man. In vitro of effects and mechanism of proanthocyanidins tetramers intervene *S.mutans* Ingbritt(c)in adherent pathway [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013
- [10] 夏伟, 王成龙, 董洁, 等. 变形链球菌葡糖基转移酶催化活性区的分子克隆及表达[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2005, 3(4): 193-195
- [11] XIA Wei, WANG Cheng-long, DONG Jie, et al. Molecule clone and express of the catalytic region of glucosyltransferase from streptococcus mutans [J]. Chinese Journal of Geriatric Dentistry, 2005, 3(4): 193-195
- [12] 于维先, 吕云庆. 变形链球菌细胞外葡萄糖基转移酶的分离和纯化[J]. 中华口腔医学杂志, 1992, 2(3): 132-135
- [13] YU Wei-xian, LV Yun-qing. Separation and purification of glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* [J]. Chinese Journal of Conservative Dentistry, 1992, 2(3): 132-135
- [14] 罗莉, 李坤, 王保成, 等. 包涵体变复性技术研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2012, 8(7): 290-293
- [15] LUO Li, LI Kun, WANG Bao-cheng, et al. The research progress of renaturation of Inclusion bodies [J]. Chinese Medicinal Biotechnology, 2012, 8(7): 290-293
- [16] 高永贵, 关怡新, 姚善涇. 包涵体蛋白的变复性研究[J]. 科技通报, 2003, 19(1): 10-15
- [17] GAO Yong-gui, GUAN Yi-xin, YAO Shan-jing. The research of renaturation of Inclusion bodies protein [J]. Bulletin of Science and Technology, 2003, 19(1): 10-15
- [18] JIA Dong-xu, YANG Yu, PENG Zheng-cong, et al. High efficiency preparation and characterization of intact poly (vinyl alcohol) dehydrogenase from *Sphingopyxis* sp.113P3 in *Escherichia coli* by Inclusion Bodies Renaturation [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172: 2540-2551
- [19] Karray A, Amara S, Fráđíc C, et al. Renaturation and one

- step purification of the chicken GIIA secreted phospholipase A2 from inclusion bodies [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 67: 85-90
- [14] 苏裕. 大肠杆菌中重组蛋白可溶性表达的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2007
- SU Yu. Studies on soluble expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* [D]. Shanghai: East China Normal University, 2007

现代食品科技