

## 论著·基础研究

## 新型口腔细菌丝氨酸蛋白酶抑制剂 Tannerpin 的制备与结晶

杨婷婷<sup>1</sup>, 许佳伟<sup>2</sup>, 周爱武<sup>3</sup>, 叶 玮<sup>1</sup>

1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔预防科, 上海交通大学口腔医学院, 国家口腔医学中心, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海 200011; 2. 遵义医科大学珠海校区, 珠海 519040; 3. 上海交通大学医学院病理生理学系, 上海 200025

**[摘要]** **目的**·采用生物化学和结构生物学的方法, 制备和结晶高纯度的新型口腔细菌丝氨酸蛋白酶抑制剂 Tannerpin。**方法**·通过氨基酸序列分析, 在牙周疾病相关细菌中筛选得到新型丝氨酸蛋白酶抑制剂, 并将其命名为 Tannerpin; 构建融合表达载体 pSUMO3-Tannerpin, 将其转入大肠埃希菌 BL21 (DE3) 系统进行诱导表达; 采用镍离子亲和层析、SUMO 特异性蛋白酶 2 (SUMO-specific protease 2, SENP2) 酶切和凝胶过滤层析组合的纯化方案对 Tannerpin 进行分离纯化, 并经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行验证; 而后, 对该纯化蛋白的结晶条件进行筛选及优化, 并对其作用底物进行筛选。**结果**·SDS-PAGE 结果显示, SUMO3-Tannerpin 融合蛋白在大肠埃希菌中成功表达。利用纯化方案去除该蛋白的融合标签后, 获得了相对分子质量约为 43 000 的 Tannerpin。通过结晶条件的初筛和优化, 最终在 20 °C、pH=6.0、沉淀剂为 28% 聚乙二醇 3350 和 8% Tacsimate 的条件下获得了分辨率为 1.7 Å 的 Tannerpin 晶体。然而, 未筛选到 Tannerpin 的作用底物。**结论**·成功制备了口腔细菌分泌的新型丝氨酸蛋白酶抑制剂 Tannerpin 及其晶体, 或将为后续其结构分析及功能研究奠定基础。

**[关键词]** 口腔细菌; 新型丝氨酸蛋白酶抑制剂; 原核表达; 纯化; 结晶

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.10.004 **[中图分类号]** Q71; R780.1 **[文献标志码]** A

## Preparation and crystallization of a novel oral bacterial serine protease inhibitor Tannerpin

YANG Ting-ting<sup>1</sup>, XU Jia-wei<sup>2</sup>, ZHOU Ai-wu<sup>3</sup>, YE Wei<sup>1</sup>

1. Department of Preventive Dentistry, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University; National Center for Stomatology; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai 200011, China; 2. Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Zhuhai 519040, China; 3. Department of Pathophysiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

**[Abstract]** **Objective**·To prepare and crystallize a novel oral bacterial serine protease inhibitor Tannerpin with high purity by means of biochemistry and structural biology. **Methods**·A novel serine protease inhibitor was screened from periodontal disease-related bacteria by amino acid sequence analysis, and named as Tannerpin. The fusion expression vector pSUMO3-Tannerpin was constructed and transferred into *E. coli* BL21 (DE3) system for induction expression. Tannerpin was isolated and purified by a combination of nickel-affinity chromatography, SUMO-specific protease 2 (SENP2) digestion and gel filtration chromatography, and was verified by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Then, the crystallization conditions of the purified protein were screened and optimized, and its acting substrates were screened. **Results**·SDS-PAGE showed that SUMO3-Tannerpin fusion protein was successfully expressed in *E. coli*. After removing the fusion label of the protein by purification scheme, Tannerpin with relative molecular weight of about 43 000 was obtained. After crystallization screening and optimization, Tannerpin crystals with a resolution of 1.7 Å were finally obtained under the conditions of 20 °C, pH=6.0, precipitant of 28% polyethylene glycol 3350 and 8% Tacsimate. However, the acting substrate of Tannerpin was not obtained. **Conclusion**·A novel serine protease inhibitor Tannerpin secreted by oral bacteria and its crystal are successfully prepared, which may lay a foundation for subsequent structural analysis and functional study.

**[Key words]** oral bacteria; novel serine protease inhibitor; prokaryotic expression; purification; crystallization

丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serine protease inhibitor, Serpin) 是一类具有相似三维空间结构的蛋白酶抑制剂, 广泛存在于各种生命物种中, 包括动物、植物、真菌、细菌、古生菌以及一些病毒<sup>[1]</sup>。缩写词 Serpin 是基于首先发现的该类蛋白具有抑制胰凝乳蛋白酶样丝氨酸蛋白酶活性而得名<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3-4]</sup>显示, 多数 Serpin 由 350~

400 个氨基酸组成, 且该家族成员之间的序列同源性不高 (大约为 25%)。典型的 Serpin 由蛋白主体和反应中心环 (reactive center loop, RCL) 组成。其中, 蛋白主体结构具有高度保守性, 通常包括 3 个  $\beta$  折叠 (A、B、C) 和 8~9 个  $\alpha$  螺旋 (hA~hI)<sup>[5]</sup>; RCL 包含了能被靶蛋白酶的底物结合位点识别的氨基酸 (即活性中心 P1)<sup>[6]</sup>, 该氨基酸为

**[作者简介]** 杨婷婷 (1994—), 女, 硕士生; 电子信箱: 1476459716@qq.com。

**[通信作者]** 叶 玮, 电子信箱: jyewei@163.com。

**[Corresponding Author]** YE Wei, E-mail: jyewei@163.com。

**[网络首发]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2045.R.20210913.1109.006.html> (2021/9/13 14:00:51)



Serpin的抑制专一性位点,如位点发生突变则可能会导致疾病的发生<sup>[7]</sup>。Serpin可分为抑制型和非抑制型<sup>[8]</sup>。大多数的Serpin家族成员具有抑制活性<sup>[9]</sup>,以独特的“自杀式底物”的方式[即其构象由严紧型(S型)转变成松弛型(R型)]调节蛋白酶的功能,从而使蛋白酶失活<sup>[10]</sup>;另一部分Serpin成员则可行使非抑制功能,如血液凝集、炎症反应<sup>[4]</sup>、激素合成和转运<sup>[11]</sup>、分子伴侣<sup>[12]</sup>及肿瘤抑制<sup>[13]</sup>等。

在人体内,除自身基因编码的36个Serpin外,众多寄生菌也可分泌多种Serpin。研究<sup>[14]</sup>显示,Serpin在体内的各种病理生理过程中可能扮演了重要角色,其中有关细菌分泌的Serpin的研究相对较少。直到2002年,Serpin可由原核生物分泌才得到首次证实<sup>[15]</sup>,且仅针对少数几个人体寄生菌分泌的Serpin进行了研究<sup>[16]</sup>。Miropin是第一个被研究的由人体寄生菌[牙周病相关病原体福氏单胞菌(*Tannerella forsythia*, Tf)]分泌的丝氨酸蛋白酶抑制剂,能够有效抑制多种丝氨酸和半胱氨酸蛋白酶,可能参与了牙周炎的发生与发展<sup>[16-17]</sup>。

研究<sup>[18-19]</sup>显示,口腔微生物菌落是仅次于肠道微生物菌落的第二大人类相关微生物群落,目前包括了超过600个的物种或种型(<http://www.homd.org>)。牙周病是一种广泛存在的多因素慢性炎症性疾病,困扰了全球约20%的人群<sup>[20-21]</sup>。Tf是一种专性寄生在牙周袋内的细菌<sup>[22]</sup>,且已有不少针对该病原菌的相关报道。Dewhirst等<sup>[23]</sup>发现了牙周内的其他相关菌,如*Tannerella* sp. BU045(又称HOT 808);且该菌所寄生的牙周袋内的丝氨酸蛋白酶活性较为异常<sup>[24]</sup>。我们通过基因组序列分析及氨基酸序列对比发现,该病原体可能分泌了一个新型Serpin,而其是否具有蛋白酶抑制活性尚未可知。基于此,本研究构建了融合表达载体pSUMO3-新型Serpin,通过原核细胞表达系统制备高纯度的新型Serpin,并对其蛋白结晶条件的筛选及作用底物的初筛,以期为进一步的结构和功能研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种与质粒** 大肠埃希菌感受态细胞BL21(DE3)、pSUMO3载体由本实验室保存并提供。本研究所用的pSUMO3载体经实验室优化,删去了小分子泛素相关修饰物蛋白(small ubiquitin-related modifier protein, SUMO)标签中最后1个甘氨酸(包括)至BamH I酶切位点前的一段碱基序列,即当融合蛋白被SUMO特异性

蛋白酶2(SUMO-specific protease 2, SENP2)酶切后,目的蛋白的N端仅残留1个丝氨酸残基,以减少过多残留氨基酸对蛋白质的结晶和结构解析的影响。

**1.1.2 试剂与仪器** 氨苄青霉素[生工生物工程(上海)股份有限公司],IPTG(Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalactoside)(上海麦约尔生物技术有限公司),十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(Invitrogen,美国),2×YT培养基(Oxoid,英国)。实验室自制:buffer A[20 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH=7.5),含500 mmol/L NaCl和20 mmol/L咪唑],buffer B[20 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH=7.5),含500 mmol/L NaCl和300 mmol/L咪唑]。蛋白质层析系统ÄKTA Prime Plus system、HisTrap HP预装柱(GE healthcare,美国),NanoDrop8000分光光度计(Thermo Scientific,美国),低温超速离心机(Eppendorf,德国),高压细胞破碎机[永联生物科技(上海)有限公司],96孔坐滴结晶板(Hampton Research,美国)。

### 1.2 方法

**1.2.1 新型Serpin的筛选与融合表达载体的构建** 通过分析口腔牙周疾病相关菌*Tannerella* sp. BU045基因组序列,并利用经典的Serpin超家族成员 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶( $\alpha$ 1-antitrypsin,  $\alpha$ 1-AT, PDB: 1QLP)和Miropin的氨基酸序列进行对比,筛选出由该菌分泌的新型Serpin。而后,将获得的Serpin基因序列交由苏州金唯智生物科技有限公司进行全基因技术合成及密码子优化,同时委托其完成融合表达载体的构建。

**1.2.2 融合蛋白的诱导表达及验证** 将“1.2.1”中构建好的融合表达载体(pSUMO3-新型Serpin)转化至BL21(DE3)中,随后涂布至含氨苄青霉素(ampicillin, Amp)的LB平板上,37℃倒置培养过夜。次日,挑选单菌落至含Amp的2×YT液体培养基中,37℃摇床培养过夜。以1:100的比例将过夜菌液接种至含Amp的2×YT培养基中,37℃摇床培养2 h。当菌液在600 nm波长处的吸光度值达0.6时,将摇床温度降至25℃并加入IPTG诱导表达过夜,而后于4℃、10 000×g离心15 min,收集菌体备用。分别于诱导前、诱导后7 h和24 h留取菌液样品,采用SDS-PAGE对融合蛋白的诱导表达情况进行验证。

**1.2.3 融合蛋白的纯化及目的蛋白的收集** 将菌体重悬于buffer A中,用高压细胞破碎机进行细菌破碎,而后高速离心菌液1 h,收集上清液并上样至HisTrap HP预装柱,待蛋白样品吸附在层析柱后,经蛋白质层析系统进一步纯化,并调节Buffer B的浓度从0逐渐增加至100%

(即通过增加咪唑的浓度,调节蛋白与镍离子的结合程度)对样品进行梯度洗脱,收取每个蛋白峰对应的样品并进行 SDS-PAGE 验证。将收集到的融合蛋白(SUMO3-新型 Serpin)经透析过夜后,向其中加入 SENP2,并在 4 °C 下经 0.22  $\mu$ m 滤膜透析过夜。将获得的透析液再次上样至 HisTrap HP 预装柱,去除 SUMO 融合标签和 SENP2,并采用 SDS-PAGE 对酶切效果进行验证。而后,使用 HiLoad 16/60 Superdex 75 pg 凝胶过滤柱对目的蛋白进一步纯化,并经 SDS-PAGE 分析验证。最终,将目的蛋白浓缩、换液,保存于-80°C。

#### 1.2.4 新型 Serpin 结晶条件的筛选、优化和晶体衍射

采用坐滴式气相扩散法对新型 Serpin 的结晶条件进行初筛,即使用自动化移液站将 Hampton Research 结晶筛选试剂盒分装至 96 孔坐滴结晶板里,由自动化结晶机器人在该结晶板上完成对蛋白晶体生长条件的筛选。针对初筛结果,选取其中生长状态较好的晶体,在 24 孔晶体生长板上进行手动优化,即通过调整沉淀剂种类及浓度、新型 Serpin 浓度、结晶温度以及 pH 值等,获得高质量蛋白晶体。将筛选得到的晶型较好的晶体取出后用液氮速冻备用,于上海同步辐射光源(Shanghai synchrotron radiation facility, SSRF)的生物大分子晶体学光束线/实验站(BL17U)收集晶体 X 射线衍射数据。

**1.2.5 新型 Serpin 作用底物的初步筛选** 于室温下,将纯化后的新型 Serpin 与作用底物按照质量比为 1:1 混匀,37 °C 孵育 30 min。而后,采用 SDS-PAGE 对上述混合液进行检测。本次新型 Serpin 作用底物的初筛范围主要为本实验室常用的蛋白酶,包括人凝血因子 II a (coagulation factor II a, F II a)、F IX a、F XI a、抗凝血蛋白 C (protein C, PC)、组织型纤溶酶原激活剂(tissue-plasminogen activator, t-PA)、人白细胞弹性蛋白酶(human leukocyte elastase, HLE)、人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶(elastase)、胰蛋白酶(trypsin)、激肽释放酶 1 (Kallikrein 1, KLK1)、KLK7、蛋白酶 3 (proteinase 3, PR3)、组织蛋白酶 B (cathepsin B, CB)、组织蛋白酶 G (cathepsin G, CG)。

## 2 结果

#### 2.1 新型 Serpin 的筛选及融合表达载体的构建

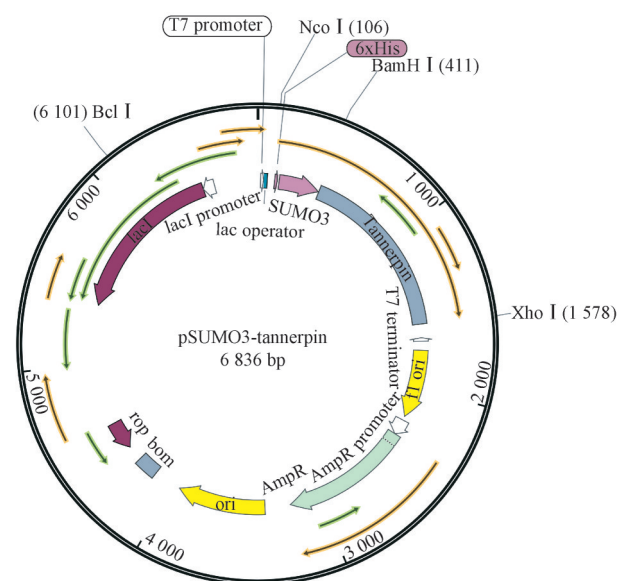
经基因组序列分析及氨基酸序列比对,本研究筛选得到了口腔牙周疾病相关菌 *Tannerella* sp. BU045 分泌的 Serpin,我们将其命名为 Tannerpin;氨基酸序列比对结果(图 1)显示, $\alpha$ 1-AT、Miropin 和 Tannerpin 的 RCL 氨基酸

序列相对保守,但活性中心有所不同,即  $\alpha$ 1-AT 的活性中心是甲硫氨酸(Met, M)、Miropin 是苏氨酸(Thr, T)、Tannerpin 则是少见的丙氨酸(Ala, A)。随后,我们以 Tannerpin 基因序列构建融合表达载体 pSUMO3-Tannerpin,图谱如图 2 所示。

Amino acid sequence number	370	380	P1
Tannerpin	EYGAEEAAVTAVHMSF	APGPD	
Miropin	EEGTAAAVTAVEMVKT	SSPS	
$\alpha$ 1-AT	EKGTEAAGAMFLEAI	PMSIPP	

图 1 Tannerpin、Miropin 及  $\alpha$ 1-AT 的 RCL 序列对比

Fig 1 Comparison of RCL sequences of Tannerpin, Miropin and  $\alpha$ 1-AT



**Note:** TANNERPIN is inserted between BamH I (5'-GGATCC-3') and Xho I (5'-CTCGAG-3').

图 2 pSUMO3-Tannerpin 的质粒图谱

Fig 2 Plasmid mapping of pSUMO3-Tannerpin

#### 2.2 融合蛋白的诱导表达、纯化及目的蛋白的获取

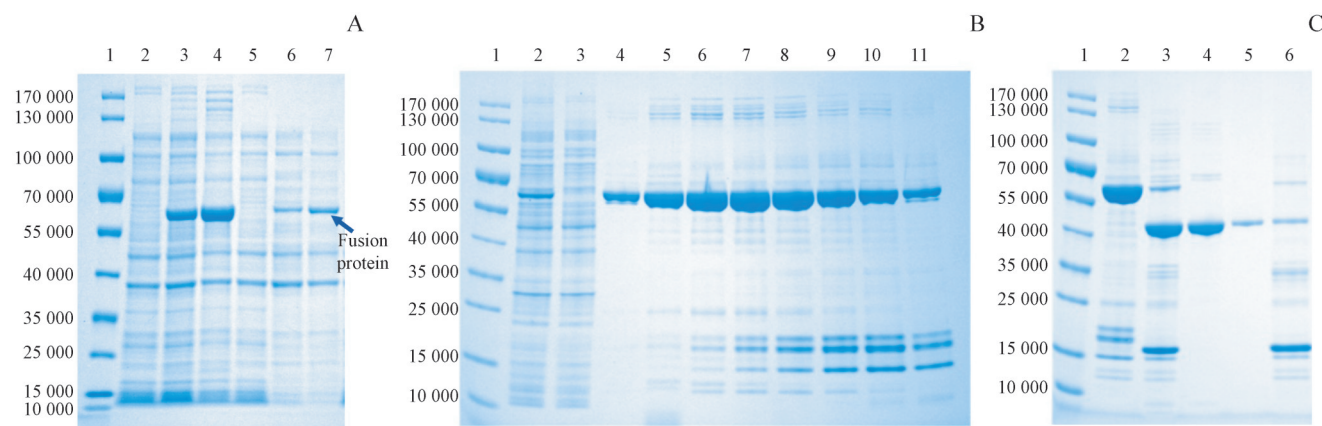
BL21 经融合表达载体 pSUMO3-Tannerpin 转化后,分别于诱导前、诱导后(7 h 和 24 h)裂解细胞,用 SDS-PAGE 检测细菌总蛋白和上清液中可溶蛋白的表达。结果(图 3A)显示,与诱导前相比,诱导后(7 h 和 24 h)的细菌总蛋白中出现了 1 条相对分子质量约为 58 000 的特异性条带,与融合蛋白的理论分子量相符,同时其上清液中也出现了少量可溶的融合蛋白;且随着诱导表达时间的延长(从 7 h 到 24 h),融合蛋白的表达量有明显增加。

随后,经蛋白质层析系统进一步纯化、洗脱后,SDS-PAGE 的检测结果(图 3B)显示,经过 HisTrap HP 预装柱后,上清液中相对分子质量 58 000 附近的蛋白条带消失了,而在后续的洗脱液中又见该蛋白条带;继而说明,洗脱下来的蛋白即为结合在 HisTrap HP 预装柱上的 SUMO3-Tannerpin。经 SENP2 酶切后再次经过 HisTrap



HP 预装柱, 用 SDS-PAGE 进行检测, 结果 (图 3C) 显示, 融合蛋白被酶切出 2 条蛋白条带, 相对分子质量分别在 43 000 和 15 000 附近 (SUMO 的相对分子质量约 15 000), 而经过 HisTrap HP 预装柱的蛋白条带在 43 000 附近, 与 Tannerpin 的理论分子量相符, 继而说明该蛋白

即为已去除 SUMO 标签的 Tannerpin。采用 HiLoad 16/60 Superdex 75 pg 凝胶过滤柱对第二次过 HisTrap HP 预装柱的透析液进行纯化并行 SDS-PAGE 检测, 发现在相对分子质量 43 000 附近有均一的蛋白条带, 即为 Tannerpin。



**Note:** A. Expression of total bacterial protein and soluble protein in supernatant before and after induction. Lane1—Marker, Lane2—total bacterial protein sample before induction, Lane3—total bacterial protein sample 7 h after induction, Lane4—total bacterial protein sample 24 h after induction, Lane5—supernatant sample before induction, Lane6—supernatant sample 7 h after induction, Lane7—supernatant sample 24 h after induction. B. SDS-PAGE detection of nickel-affinity chromatography for the first time. Lane1—Marker, Lane2—supernatant, Lane3—flow-through solution after the nickel column, Lane4–11—eluate. C. SDS-PAGE detection of nickel-affinity chromatography for the second time. Lane1—Marker, Lane2—SENP2 before digestion, Lane3—SENP2 after digestion, Lane4—flow-through solution after the nickel column, Lane5—equilibrium solution, Lane6—eluate.

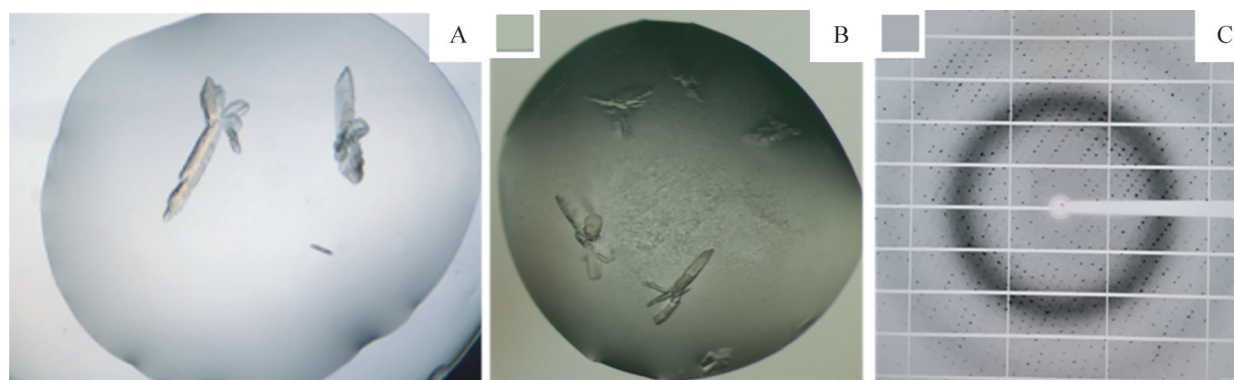
**图 3** 融合蛋白 (SUMO3-Tannerpin) 的诱导表达、纯化及验证

**Fig 3** Induced expression, purification and validation of fusion protein (SUMO3-Tannerpin)

### 2.3 Tannerpin 结晶条件的筛选、优化和晶体衍射结果

首先, 我们尝试在 20 °C、20% 聚乙二醇 8000、0.1 mol/L Tris (pH=8.5)、0.2 mol/L MgCl<sub>2</sub> 条件下对 Tannerpin 进行结晶, 得到了小的、片状、针状及不规则状的晶体 (图 4A)。在此初筛基础上, 我们对晶体条件进行优化,

即在 20 °C、Tannerpin 浓度为 15 mg/mL、结晶 pH=6.0、沉淀剂为 28% 聚乙二醇 3350 和 8% Tacsimate 条件下, 获得了更大、形状更好的蛋白晶体 (图 4B)。随后, 对优化的状态较好的 Tannerpin 晶体进行 X 射线衍射分析, 结果 (图 4C) 显示该晶体的分辨率为 1.7 Å (1 Å=10<sup>-10</sup> m)。



**Note:** A. Tannerpin crystal under primary screening. B. Tannerpin crystal under optimized conditions. C. X-ray diffraction result of optimized Tannerpin crystal.

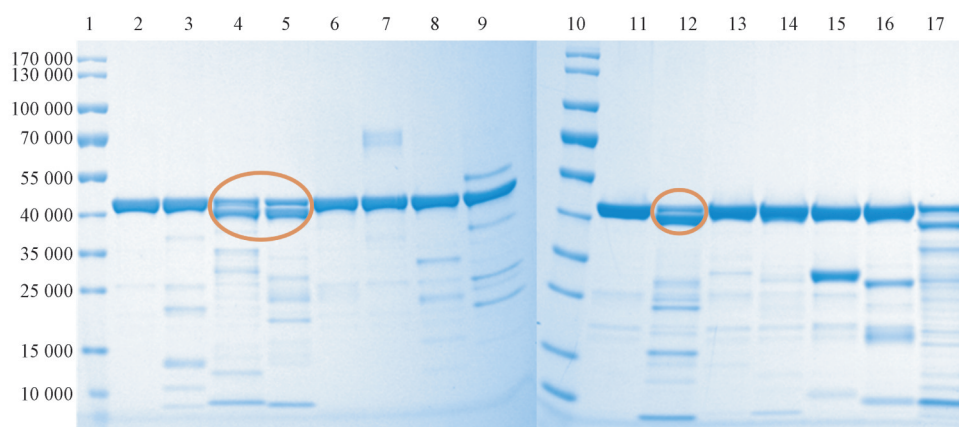
**图 4** Tannerpin 蛋白结晶条件的筛选、优化及晶体 X 射线衍射

**Fig 4** Screening and optimization of crystallization conditions of Tannerpin protein and its crystal X-ray diffraction

### 2.4 Tannerpin 作用底物的初步筛选

SDS-PAGE 检测结果 (图 5) 显示, 泳道 4 (HLE)、5 (elastase)、12 (trypsin) 蛋白酶将 Tannerpin 作为了解底物, 即在相对分子质量 43 000 附近的

Tannerpin 因被上述 3 个靶酶消耗而减少, 出现了蛋白条带下移。



**Note:** Lane1/10—Marker, Lane2, 11—Tannerpin. The other lanes are mixed solutions of Tannerpin and substrate. The specific substrates are Lane3—F II a, Lane4—HLE, Lane5—elastase, Lane6—PC, Lane7—t-PA, Lane8—FXa, Lane9—FXIa, Lane12—trypsin, Lane13—CB, Lane14—CG, Lane15—KLK1, Lane16—KLK7, Lane17—PR3.

**图5** Tannerpin 作用底物的初步筛选结果

**Fig 5** Preliminary screening results of Tannerpin substrates

### 3 讨论

众所周知, Serpin 在生物体内发挥着重要且广泛的病理生理作用, 其功能障碍与多种疾病相关。目前, 有关人体编码 Serpin 的结构与功能的报道较多。例如, 在炎症肠道疾病中  $\alpha 1$ -AT 的表达水平会发生改变, 而在给炎症肠道疾病小鼠使用 Serpin 后, 其炎症得到有效抑制, 组织损伤有所减轻<sup>[25]</sup>; 相关临床数据表明, 在肥胖及 2 型糖尿病患者的脂肪组织中, Vaspin 大量表达<sup>[26]</sup>; 有研究<sup>[27]</sup>证实, 非抑制型丝氨酸蛋白酶抑制剂 Maspin 与乳腺癌和前列腺癌高度相关, 可以帮助推测患者的预后情况。细菌在人体健康中扮演了非常重要的角色, 通过参与多种病理生理过程发挥维持稳态、调节免疫等作用<sup>[28]</sup>。例如, 具核梭杆菌 (*Fusobacterium*, Fn) 在结直肠癌组织中富集, 能够通过 TIGIT (T-cell immunoglobulin and ITIM domain) 抑制 T 细胞和自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK cell, NK 细胞) 的抗肿瘤作用, 帮助癌细胞进行免疫逃逸, 从而促进结直肠癌的发展<sup>[29]</sup>; 相关动物实验证明, 清除肠道中的 Fn 可以抑制肿瘤生长, 并有助于恢复肿瘤小鼠对化学治疗药物的敏感性<sup>[30]</sup>。

虽然在人体内存在大量的 Serpin, 但其中仅有 36 个 Serpin 是由人的基因组编码, 其余大部分则是由肠道菌群和口腔菌群分泌, 且鲜少有关于这些细菌的 Serpin 的研究<sup>[5]</sup>。牙周致病菌 Tf 分泌的 Miropin 具有广泛的抑制活

性, 能够有效抑制多种丝氨酸和半胱氨酸蛋白酶, 推测该菌在牙周病的致病过程中可发挥毒力作用<sup>[16]</sup>。本研究通过对比口腔牙周疾病相关菌 *Tannerella* sp. BU045 的基因组序列及 Serpin 超家族成员  $\alpha 1$ -AT、Miropin 的氨基酸序列, 筛选到该菌分泌的一种新型 Serpin, 即为 Tannerpin; 同时还发现,  $\alpha 1$ -AT、Miropin 和 Tannerpin 的 RCL 氨基酸序列均相对保守, 但活性中心有所不同, 其中 Tannerpin 是以少见的丙氨酸作为其活性中心。在大肠埃希菌 BL21 (DE3) 原核表达系统中成功表达融合蛋白 SUMO3-Tannerpin, 经纯化、酶切、验证后得到目的蛋白 Tannerpin, 再经对该抑制剂结晶条件的初筛及优化, 最后在 Tannerpin 浓度为 15 mg/mL、结晶 pH=6.0、沉淀剂浓度为 28% 聚乙二醇 3350 和 8% Tacsimate 的条件下, 获得了分辨率为 1.7 Å 的 Tannerpin 晶体。在 Tannerpin 作用底物的初筛实验中, 我们发现其并不能有效抑制一些常见的丝氨酸蛋白酶如 HLE、elastase 和 trypsin, 而是作为它们的水解底物被分解 [即当 Tannerpin 与上述底物发生反应时, 其 RCL 插入 A- $\beta$  折叠片层中的速度较慢, 使 Tannerpin 与靶酶形成的共价结合在靶酶失活前被破坏, 因此 Tannerpin 则会作为靶酶的水解底物被消耗, 一般表现为其 RCL 被切断 (多发生在 P1 位点)], 这可能是由于底物筛选范围 (仅来自于本实验室) 较窄所致。后续, 我们将扩大筛选范围来寻找 Tannerpin 的作用底物, 同时解析其三维空间结构, 对其作用机制与功能进行更深入的探索。

## 参·考·文·献

- [1] Law RH, Zhang Q, McGowan S, et al. An overview of the serpin superfamily[J]. *Genome Biol*, 2006, 7(5): 216.
- [2] Carrell R, Travis J.  $\alpha$ 1-Antitrypsin and the serpins: variation and countervariation[J]. *Trends Biochem Sci*, 1985, 10(1): 20-24.
- [3] Song J, Matthews AY, Reboul CF, et al. Predicting serpin/protease interactions[J]. *Methods Enzymol*, 2011, 501: 237-273.
- [4] Huntington JA. Serpin structure, function and dysfunction[J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9(Suppl 1): 26-34.
- [5] Mkaouer H, Akermi N, Kriaa A, et al. Serine protease inhibitors and human wellbeing interplay: new insights for old friends[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e7224.
- [6] Irving JA, Shushanov SS, Pike RN, et al. Inhibitory activity of a heterochromatin-associated serpin (MENT) against papain-like cysteine proteinases affects chromatin structure and blocks cell proliferation[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(15): 13192-13201.
- [7] Marijanovic EM, Fodor J, Riley BT, et al. Reactive centre loop dynamics and serpin specificity[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 3870.
- [8] Gettins PG. Serpin structure, mechanism, and function[J]. *Chem Rev*, 2002, 102(12): 4751-4804.
- [9] Ray CA, Black RA, Kronheim SR, et al. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 $\beta$  converting enzyme[J]. *Cell*, 1992, 69(4): 597-604.
- [10] Zhou A, Wei Z, Stanley PL, et al. The S-to-R transition of corticosteroid-binding globulin and the mechanism of hormone release[J]. *J Mol Biol*, 2008, 380(1): 244-251.
- [11] Pemberton PA, Stein PE, Pepys MB, et al. Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation[J]. *Nature*, 1988, 336(6196): 257-258.
- [12] Nagata K. Hsp47: a collagen-specific molecular chaperone[J]. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21(1): 22-26.
- [13] Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells[J]. *Science*, 1994, 263(5146): 526-529.
- [14] Gaci N, Dobrijevic D, Boudebouze S, et al. Patented biotechnological applications of serpin: an update[J]. *Recent Pat DNA Gene Seq*, 2013, 7(2): 137-143.
- [15] Irving JA, Steenbakkens PJ, Lesk AM, et al. Serpins in prokaryotes[J]. *Mol Biol Evol*, 2002, 19(11): 1881-1890.
- [16] Ksiazek M, Mizgalska D, Enghild JJ, et al. Miropin, a novel bacterial serpin from the periodontopathogen *Tannerella forsythia*, inhibits a broad range of proteases by using different peptide bonds within the reactive center loop[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(1): 658-670.
- [17] Goulas T, Ksiazek M, Garcia-Ferrer I, et al. A structure-derived snap-trap mechanism of a multispecific serpin from the dysbiotic human oral microbiome[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(26): 10883-10898.
- [18] Warinner C, Speller C, Collins MJ. A new era in palaeomicrobiology: prospects for ancient dental calculus as a long-term record of the human oral microbiome[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2015, 370(1660): 20130376.
- [19] Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque[J]. *J Bacteriol*, 2001, 183(12): 3770-3783.
- [20] Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, et al. The global burden of oral diseases and risks to oral health[J]. *Bull World Health Organ*, 2005, 83(9): 661-669.
- [21] Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis[J]. *Periodontol* 2000, 2005, 38: 72-122.
- [22] Socarransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, et al. Microbial complexes in subgingival plaque[J]. *J Clin Periodontol*, 1998, 25(2): 134-144.
- [23] Dewhirst FE, Chen T, Izard J, et al. The human oral microbiome[J]. *J Bacteriol*, 2010, 192(19): 5002-5017.
- [24] Belaouaj A. Neutrophil elastase-mediated killing of bacteria: lessons from targeted mutagenesis[J]. *Microbes Infect*, 2002, 4(12): 1259-1264.
- [25] Collins CB, Aherne CM, Ehrentauf SF, et al.  $\alpha$ 1-Antitrypsin therapy ameliorates acute colitis and chronic murine ileitis[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19(9): 1964-1973.
- [26] Teshigawara S, Wada J, Hida K, et al. Serum vaspin concentrations are closely related to insulin resistance, and rs77060950 at SERPINA12 genetically defines distinct group with higher serum levels in Japanese population[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(7): E1202-E1207.
- [27] Teoh SS, Vieusseux J, Prakash M, et al. Maspin is not required for embryonic development or tumour suppression[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3164.
- [28] Wang WL, Xu SY, Ren ZG, et al. Application of metagenomics in the human gut microbiome[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(3): 803-814.
- [29] Cremonesi E, Governa V, Garzon JFG, et al. Gut microbiota modulate T cell trafficking into human colorectal cancer[J]. *Gut*, 2018, 67(11): 1984-1994.
- [30] Yu T, Guo F, Yu Y, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy[J]. *Cell*, 2017, 170(3): 548-563. e16.

[收稿日期] 2021-01-27

[本文编辑] 邢宇洋

