

家蚕抗菌肽 CM4 和人可溶性 BAFF 融合基因的克隆、表达及活性鉴定

刘海峰, 刘 平, 李楠楠, 张双全

(江苏省分子医学生物技术重点实验室, 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 采用 PCR 法从含有人可溶性 BAFF 基因的 pET30a(+) 扩增得到人 sBAFF 基因, 通过 rPCR 将抗菌肽 Cecropin CM4 基因的 2 条单核苷酸链进行扩增得到 CM4 基因, 再采用 over lap PCR 法通过 linker 将 hsBAFF 与 Cecropin CM4 融合基因相连接. 经纯化和鉴定后, 定向插入到原核表达载体 pET30a(+) 中, 然后转化 *E. coli* BL21(DE3), 通过实验确定了表达该融合基因的最佳诱导条件: IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L, 诱导时间为 5 h 温度为 30℃, 其表达量占全菌蛋白的 40%. 表达产物经 SDS-PAGE 分析, 得到相对分子质量约为 22 000 的重组蛋白并且存在超声裂解后的上清中. 重组蛋白经 Western blot 检测, 结果显示重组蛋白可被鼠抗人可溶性 BAFF 的抗体识别. 采用分子筛 Sephadex G-75 对重组融合蛋白进行纯化, 并经 SDS-PAGE 对其鉴定. 通过对其生物学功能的检测得知, 纯化后的重组融合蛋白对大肠杆菌 K₁₂D₃₁ 和真菌有明显的抑菌能力.

[关键词] 抗菌肽 CM4, 人的可溶性 BAFF, 抗菌活性, 融合基因, 大肠杆菌, 表达

[中图分类号] R392.11 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008)02-0087-05

Cloning Expression and Characterization of a Bi-functional Antibacterial Peptides CM4 and hsBAFF Fusion Protein in Escherichia Coli

Liu Haifeng, Liu Ping, Li Nannan, Zhang Shuangquan

(Jiangsu Province Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, School of Life Science,
Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract The cDNA of human soluble B lymphocyte stimulator (hsBAFF) was amplified by PCR from pET30a(+) and the gene of antibacterial peptide CM4 by rPCR. The fusion gene of hsBAFF and CM4 was amplified by using over lap PCR. The prokaryotic expression plasmid pET30a(+) /hsBAFF-CM4 was constructed with recombinant DNA techniques after purifying and identifying the DNA fragment. Then the plasmid pET30a(+) /hsBAFF-CM4 was transformed into BL21(DE3) cells and the expression was optimized with proper inducing conditions of 1.0 mmol/L IPTG, 5 h and 30℃ induction. The expression level of the target fusion protein reached 40% of the total bacterial protein. The results of SDS-PAGE indicated that molecular weight of the expressed protein was about 22 000 and the expressed protein mainly existed in the supernatant after sonication. Western blot analysis proved that the recombinant protein has good reactive ability against mouse anti-human soluble BAFF IgG. The expression product was purified by Sephadex G-75. The purified recombination protein displayed antimicrobial activity obviously.

Key words Antibacterial peptide CM4, hsBAFF, fusion gene, *E. coli*, expression

昆虫虽然没有完整的防御系统来保护自己, 但却能抵抗细菌和真菌的感染. 大量研究发现, 在昆虫、动物的组织中存在各种抗菌肽, 它可作为防御系统抵抗细菌和真菌的感染, 对机体起到重要的保护作用^[1]. 抗菌肽可作用于细菌和真菌的膜系统, 而不对自身的膜系统造成破坏作用. 几十年前, 科研工作者已经从动物体内得到多种抗菌肽, 有 15~45 个氨基酸且带正电荷. 主要通过其疏水表面来发挥作用^[2].

中国家蚕抗菌肽 Cecropin CM4 是张双全^[3]等首先从家蚕中提取出来的, 是一种阳离子的小肽, 有 35

收稿日期: 2007-07-03

基金项目: 国家自然科学基金(30271093), 江苏省自然科学基金(BK2005140)资助项目.

通讯联系人: 刘 平, 博士, 副教授, 研究方向: 生化与分子生物学的教学与研究. E-mail: l_ping0805@yahoo.com.cn

个氨基酸,具有一定的抗菌活性。Cecropin CM4 是两亲性的, N 末端带有正电荷, C 末端带有疏水结构, Cecropin CM4 通过作用于细胞膜来杀伤细菌、真菌和肿瘤细胞的, 而对其自身的细胞没有杀伤作用^[4], 几类抗菌肽已成功应用于临床^[5]。

人 B 淋巴细胞刺激因子 (hBAFF) 是一种细胞因子, 它属于 TNF 超家族, 与人体免疫密切相关; 它是 II 型跨膜蛋白, 能刺激 B 淋巴细胞的分化与增殖, 并诱导其分泌免疫球蛋白, 来提高免疫低下或缺乏病人的自身免疫能力。B 淋巴细胞刺激因子 (B lymphocyte stimulator Blys), 又称 TALL-1 (TNF-and ApoL-related leukocyte expressed ligand 1)、BAFF (B cell activating factor belonging to the TNF family)、THANK (TNF homologue that activates apoptosis NF2kB and JNK), 属于肿瘤坏死因子 (TNF) 家族, 是 Shu 等^[6]于 1999 年首先发现并克隆的一种新细胞因子。

随着抗菌素的广泛应用, 细菌的耐药性越来越强。抗菌素药物在临床上的应用受到了限制。但 Cecropin CM4 不仅能够耐酸、耐碱、耐热, 并且具有不产生耐药性的特点, 因此成为临床的候选药物。但是, 从家蚕中提取天然 Cecropin CM4 的量少, 成本昂贵, 因而不能满足需求。若能在原核生物中表达出具有生物学活性的 hsBAFF 和 Cecropin CM4 的融合蛋白, 以 B 细胞淋巴瘤过表达的 BAFF 受体作为靶点用来治疗 B 细胞淋巴瘤, 将会有重大的实际意义。本研究采用 PCR 及 overlap PCR 等方法, 运用酶切和连接等重组手段, 将 hsBAFF 和 Cecropin CM4 的融合基因定向插入原核表达载体 pET30a(+), 构建成 pET30a(+)/hsBAFF-CM4 融合表达载体, 并采用已广泛用来生产重组蛋白的大肠杆菌来获得融合蛋白, 不仅可用于杀伤细菌、真菌, 还可能成为治疗 B 细胞淋巴瘤的候选药物。本文描述了重组抗菌肽的克隆、表达及其生物活性的初步鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 BL21 (DE3) 用作表达菌株; 大肠杆菌 DH5 α 用作亚克隆和质粒复制菌株; 大肠杆菌 K12 D31 和 2 种真菌 (*A. niger*, *P. chrysogenum*) 用作抑菌活性的检测菌株。pET30a(+) 菌株由本实验室保存。含有人的可溶性 BAFF 的 pET30a(+) 质粒由本实验室构建, 中国家蚕抗菌肽 CM4 的 2 条单核苷酸链由 BD-TECH 公司合成。PCR 引物按照已报道的人的可溶性 BAFF、抗菌肽 CM4 基因及 hsBAFF 和 CM4 之间的 linker 进行设计。

1.1.2 主要试剂

所有的 DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Ex Taq 聚合酶、质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、核酸相对质量标准都购于 Takara 公司。琼脂糖为 Spanish 公司产品; 卡那霉素和 IPTG 为 Sigma 公司产品; 酵母浸出粉、胰蛋白胨为 Oxoil 公司产品; PVDF 转移膜为 Gilmann 公司产品; 鼠抗人 hsBAFF 的抗体由本实验室制备; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 的抗体购于博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 构建人可溶性 BAFF 和抗菌肽 CM4 的融合基因

利用两个引物从含有人可溶性 BAFF 基因 (基因序列号: AF116456) 的 pET30a(+) 对其进行 PCR 扩增, 并添加相应的酶切位点和 linker 引物为: BAFF-F1: 5'-AGGCATATGATGGCCGTTCAAGGTC-3' 和 BAFF-B1: 5'-CATCTACGACC TTCAATCAGCAGTT-3'。抗菌肽 CM4 基因由 BDTECH 公司合成的 2 条单核苷酸链进行扩增, 然后再通过 PCR 来添加相应的酶切位点和 linker 引物分别为: CM4-F1: 5'-AACTGCTGATTTGAAGGT AGATGGAAGA-3' 和 CM4-B1: 5'-GCCGGAATTCCTAAATAGTAGCA GCTTC-3' (带下划线的核苷酸分别为 *Nde*I 和 *Eco*R I 的识别位点, 斜体字代表人可溶性 BAFF 和抗菌肽 CM4 之间的 linker)。利用 Ex Taq 聚合酶在 95℃ 变性 1 min, 52℃ 复性 45 s, 72℃ 延伸 1 min 进行 25 个循环, 得到的 PCR 产物即为人可溶性 BAFF、抗菌肽 CM4 基因的 PCR 反应条件与人可溶性 BAFF 的 PCR 反应条件相同。

为了获得人可溶性 BAFF 和抗菌肽 CM4 的融合基因, 将 PCR 得到的人可溶性 BAFF 和抗菌肽 CM4 基因作为模板, 利用 overlap PCR 法将 1 μ L 的 BAFF-F1 和 CM4-B1 引物, 在 Ex Taq 聚合酶的作用下进行

扩增, 95℃变性 1 m in, 54℃复性 45 s, 72℃延伸 1 m in, 进行 25 个循环而得到。

1.2.2 原核表达重组质粒的构建和目的蛋白的表达纯化

融合基因经过 *Nde*I 和 *Eco*R I 消化后, 切胶纯化片断, 以 T4 DNA 连接酶连接到经同样酶切的 pET30a (+) 质粒上, 连接产物转化至感受态的 DH5α 中, 利用酶切鉴定构建质粒, 构建的质粒命名为: pET30a (+) /hsBAFF- CM 4 构建的质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中, 然后在 100 mL 含 50 μg/mL 的卡那霉素 LB 培养基 (1% 的蛋白胨, 0.5% 的酵母抽提粉, 85 mmol/L 的氯化钠) 中 30℃ 培养过夜, 直到 A 值达到 0.6 然后在培养基中加 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L, 诱导 5 h 诱导后的大肠杆菌在 4℃, 12 000 r/min 离心 15 m in, 重悬于 10 mL 50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中. 超声破碎后, 在 4℃, 12 000 r/min 离心 15 m in, 溶解在 8 mL 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中. 然后经分子筛 Sephadex G- 75 分离融合蛋白, 纯化后的蛋白溶液用 Centricon30 进行浓缩, 最后经 0.22 μm 的滤膜过滤, 得到的蛋白溶液经 SDS- PAGE 电泳进行鉴定。

1.2.3 SDS- PAGE 和 Western blotting 分析

按照 Laemmli 的方法在 13% 的 SDS- PAGE 上进行电泳. 纯化的融合蛋白和 2 倍浓度的上样缓冲液 (125 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 20% 甘油, 4% SDS, 0.005% 溴芬蓝和 10% 的 β- 巯基乙醇) 等量混合, 上样电泳, 电泳后用考马斯亮蓝 R- 250 染色. 进行 Western blotting 时, 融合蛋白在还原的条件下, 在 13% 的 SDS- PAGE 上进行电泳, 然后转到 PVDF 膜上, 用 TBS (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0) 冲洗膜 20 m in, 非专一性结合的蛋白用 5% MTBS (skim milk in TBS, pH 7.4) 来屏蔽. 再用 TBST (含 0.05% Tween 20 的 TBS) 洗 3 次, 每次 15 m in, 然后加入按照 1: 10 000 用 TBST 稀释过的鼠抗人 hsBAFF 抚育 3 h, 再用 TBST 洗 3 次, 每次 10 m in, 再加入按照 1: 30 000 用 TBST 稀释过的带有辣根过氧化物酶的羊抗鼠的 IgG, 然后用 TBST 洗 3 次, 每次 5 m in, 最后加入 3, 3', 5, 5', - tetramethyl benzidine (TMB) 避光显色。

1.2.4 抗菌活性检测

hsBAFF- CM 4 的融合蛋白按照如下方法进行活性检测. 在含有大肠杆菌 K₁₂D₃₁ 的培养基上打孔, 大约 4 mm, 一系列梯度的融合蛋白 (蛋白浓度为: 15 μg/mL) 加到孔中, 培养基在烘箱中过夜培养 (12~ 14 h), 然后测定抑菌圈直径的大小。

在 96 孔板中加入 20 μL 的重组蛋白和 100 μL 或者 80 μL 对数生长期的细菌或真菌混合液体, 蛋白的终浓度为 5, 10, 20, 30, 40 μmol/L, 分别在 37℃ 或 28℃ 的烘箱中培养 14 h 或 48 h 后, 在 600 nm 处测吸光值, 然后取低吸光值处对应蛋白浓度的蛋白在固体培养基 (含有对数期的细菌) 和马铃薯培养基 (含有真菌) 上涂板, 14 h 和 28 h 后, 无细菌或真菌生长对应的蛋白浓度定义为最小抑制浓度。

2 结果和分析

2.1 融合基因的克隆

分别以 pET30a (+) 和 2 条单核苷酸链为模版, BAFF- F1, BAFF- B1 和 CM4- F1, CM4- B1 为引物, 扩增的 hsBAFF 和抗菌肽 CM 4 的基因片段大约是 490 bp 和 110 bp, 再以扩增的 hsBAFF 和抗菌肽 CM 4 基因为模板, BAFF- F1 和 CM4- B1 为引物, 扩增的融合 hsBAFF- CM 4 的基因片段大约是 600 bp (如图 1)。

2.2 原核表达重组质粒的构建和重组子的鉴定

融合基因片段与 pET30a (+) 连接, 构建重组质粒 pET30a (+) /hsBAFF- CM 4 (如图 2), 通过质粒大小及酶切分析对其进行鉴定. 用 *Nde*I 和 *Eco*R I 双酶切 pET30a (+) /hsBAFF- CM 4 经琼脂糖电泳分析得到约为 5 400 bp 的线性片段和 600 bp 的插入片

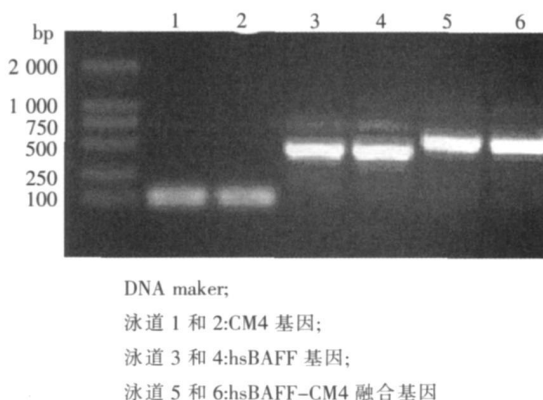


图 1 rPCR, PCR 和 over-lap PCR 产物琼脂糖凝胶上电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of rPCR, PCR and ver-lap PCR products

段(如图 3). 表明成功构建出 hsBAFF – CM4 融合基因的原核表达重组质粒.

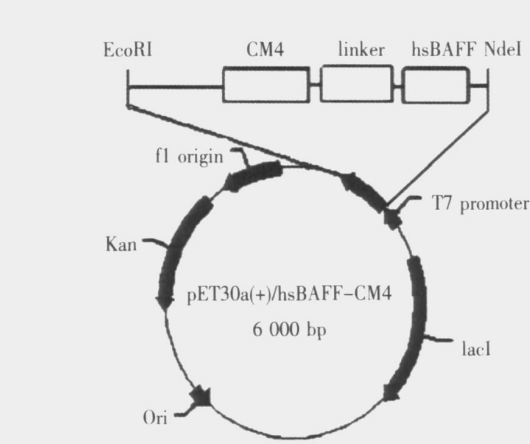
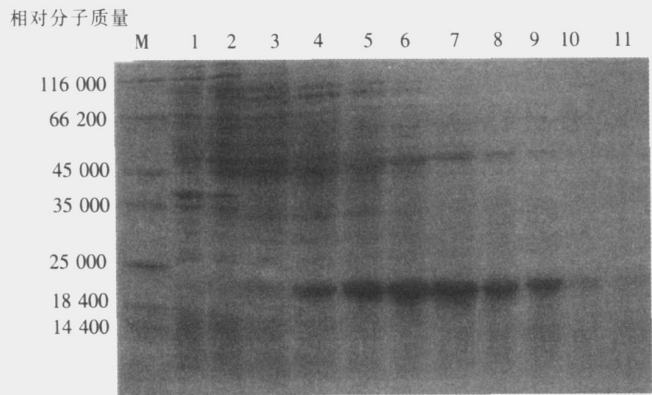


图 2 重组质粒 pET30a(+)/hsBAFF-CM4 构建
Fig.2 Schematic representation of the expression vector:
pET30a(+)/hsBAFF-CM4

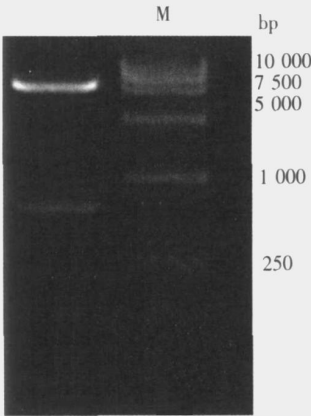
2.3 SDS – PAGE 分析和 Western blot 分析

将插入正确序列的重组表达载体转化大肠杆菌 BL21 (DE3)后,经 IPTG 诱导表达,经 SDS-PAGE 分析,结果显示所表达的目的蛋白主要位于超声裂解后上清中. 全菌裂解液进行 SDS – PAGE,然后用考马斯亮蓝 R – 250 染色. 结果显示,重组目的蛋白相对分子质量约为 22 000,灰度扫描显示目的蛋白表达量占菌体总蛋白的 40% 左右,说明融合蛋白在大肠杆菌中获得了高效表达(如图 4).

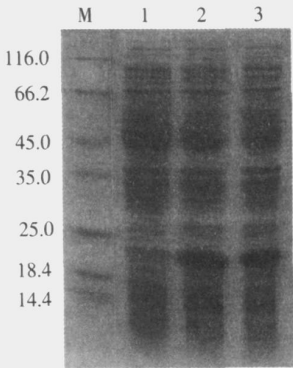
将诱导表达的融合蛋白溶液经分子筛 Sephadex G – 75 初步纯化后进行 SDS – PAGE 电泳(如图 5). 表达产物经 SDS – PAGE,电转移至 PVDF 转移膜上,以鼠抗人 hs-BAFF 的抗体为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 的抗体为二抗,TMB 为底物,进行蛋白印迹分析(如图 6). 图中可见 22 000 处有一条明显的蛋白印迹.



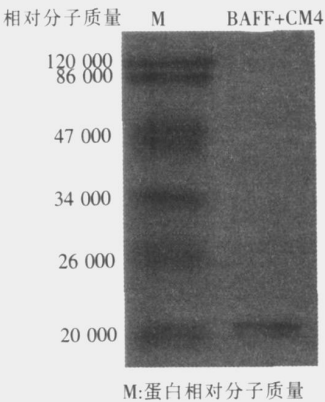
M:蛋白相对分子质量;1~11:经 Sephadex G-75 各收集管蛋白电泳
图 5 SDS-PAGE 电泳分析纯化的融合蛋白
Fig.5 SDS-PAGE analysis of expression products purified by Sephadex



左边: 酶切产物;M: DNA 相对分子质量
图 3 重组质粒经过 NdeI 和 EcoRI 酶切后琼脂糖凝胶电泳
Fig.3 The plasmids were digested by NdeI and EcoRI



M: 蛋白相对分子质量; 1:未诱导; 2,3:诱导 5 h
图 4 SDS-PAGE 电泳分析表达产物
Fig.4 SDS-PAGE analysis of expression products



M:蛋白相对分子质量
图 6 免疫检测专一结合融合蛋白 BAFF
Fig.6 Western blot analysis to show the specific binding of the hsBAFF fraction of the fusion protein

2.4 融合蛋白活性检测

融合蛋白对大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$ 的抑菌能力,用培养基上出现的抑菌圈的直径来进行初步检测,以去离子水作阴性对照.一系列纯化的融合蛋白先用 PBS(pH 7. 2)缓冲液透析 3 次,每次 2h,经透析过夜后加到含有 $K_{12}D_{31}$ 培养基的孔中,在 37℃的培养箱中过夜(12~ 14 h)培养,最后测定抑菌圈直径的大小.抑菌结果显示: 2 μ L 融合蛋白(浓度为: 15 μ g/ mL)形成的抑菌圈大约为 9~ 10 mm; 5 μ L融合蛋白(浓度为: 15 μ g/mL)形成抑菌圈大约为 14~ 15mm (如图 7).

重组蛋白对细菌和真菌的最小抑制浓度如表 1 该重组蛋白对微生物有较强的抑制作用.

表 1 重组蛋白对微生物的最小抑制浓度

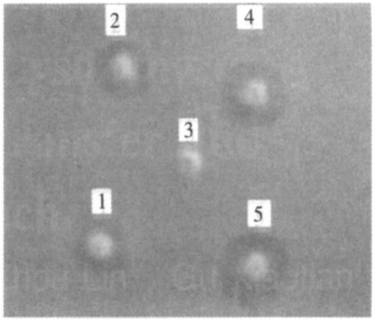
Table 1 Antimicrobial activity of recombinant protein

Microorganism	MIC / μ mol/L
<i>E. coli</i> $K_{12}D_{31}$	6
<i>Aspergillus niger</i>	10
<i>Penicillium chrysogenum</i>	30

3 讨论

抗菌肽是昆虫免疫系统血淋巴中的一类抗菌多肽,可以抑杀某些真菌、病毒及病原虫,并对多种癌细胞及动物实体瘤有明显的杀伤作用,但对正常细胞不起作用,抗菌肽有望成为新一代抗菌、抗病毒和抗癌的药物.但天然抗菌肽的来源少、成本高,无法满足临床应用.通过重组 DNA 技术来表达有活性的抗菌肽,与人工合成的抗菌肽相比,有相当诱人的前景.抗菌肽是一种小肽,因而不宜单独克隆表达抗菌肽,通常以融合的形式进行克隆表达,大多数的抗菌肽通常与载体上携带的蛋白相融合表达,针对载体本身携带的蛋白难以切割,以及融合蛋白可以与 B 细胞淋巴瘤发病中过表达 BAFF 受体结合的特点,我们首次报道了把人可溶性 B 淋巴细胞刺激因子和抗菌肽 CM 4 进行融合表达.研究结果显示,融合蛋白具有一定的抑菌能力,对 hsBAFF 抗体也有特异性结合能力.对 B 细胞淋巴瘤的作用还有待于进一步的研究.

通过构建了 pET30a(+) /hsBAFF- CM 4 融合表达质粒,重组的 hsBAFF- CM 4 融合基因在 T7 启动子的作用下表达水平较高,可达总菌体蛋白的 40%.通过分子筛 Sephadex G- 75 将目的蛋白初步进行分离后,将易于进一步纯化,为研制治疗 B 细胞淋巴瘤的特效药物奠定了良好基础.



孔 1:2 μ L,孔 2:3 mL,孔 4:4 μ L,孔 5:5 μ L,孔 3:去离子水

图 7 融合蛋白对大肠杆菌的抑菌活性检测

Fig.7 The antibacterial activity assay of the fusion protein on *Escherichia coli* $K_{12}D_{31}$

[参考文献]

[1] Ma loy W L, Kari U P. Structure activity studies on magainins and other host defense peptides[J]. Biopolymers 1995 37 (2): 105-122

[2] Bon an H G. Antibacterial peptides basic facts and emerging concepts[J]. J Intem Med 2003 254(3): 197-215.

[3] T Y izeng, Zhang S Q, Qu X M. Separation, purification of antibacterial CM 4 and the research of the structure and character [J]. Sci China B 1989, 32(3): 473-480

[4] Zhang S Q, Jia H W, Dai Z Y. Ultrastructure observation of K 562 leukemia cells treated with antibacterial peptide CM 4 component[J]. Prog Biochem Biophys 1997, 24(2): 159-163

[5] Andres E, D inarq J L. Cationic antimicrobial peptides from innate immunity study to drug development[J]. Rev Med Ir tem 2004, 25(2): 629-635.

[6] Shu H B, Hu W H, Johnson H. TALL21 is a novel member of the TNF family that is down2regulated by mitogens[J]. J Leukoc Biol 1999, 65(5): 680-683

[责任编辑: 孙德泉]