

黑腹果蝇抗真菌肽 Drosomycin 同系物的 免疫原性和抗真菌活性

杨婉莹¹, 刘文权¹, 邓小娟¹, 段云¹, 黄亚东², 温硕洋³, 夏庆友⁴, 曹阳^{1,*}

(1. 华南农业大学动物科学学院蚕丝科学系, 广州 510642; 2. 暨南大学医药生物技术研究开发中心, 广州 510632;
3. 华南农业大学资源与环境学院昆虫学系, 广州 510642; 4. 西南大学农业部蚕桑学重点实验室, 重庆 400716)

摘要: 通过黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 抗真菌肽 Drosomycin(Drs)及其同系物 Drs-1C 和 Drs-1E 的抗体制备及 Western blotting 结果, 分析了 Drs 同系物的免疫原性与其抗真菌活性的关系。研究采用了 2 种技术路线, 分别将 Drs、Drs-1C 和 Drs-1E 基因构建成与细胞生长因子基因 *afgf* 融合的重组表达质粒 pET-afgf-Drs、pET-afgf-C 和 pET-afgf-E, 以及通过基因同向串联获得重组表达质粒 pRSET-2Drs、-4Drs、-6Drs 和 pRSET-2E、-4E、-6E, 并将这些重组表达质粒转化到 BL21(DE3)_{plys}S 受体菌进行诱导表达。分离纯化后的融合蛋白 afgf-Drs、afgf-C 和 afgf-E 以及串联蛋白 4 Drs、4 Drs-1E 分别免疫小白鼠获得相应的抗血清。Western blotting 免疫原性检测结果表明, Drs 及其同系物与各自的抗血清具有强的免疫反应, 同时相互间也有交叉免疫反应, 提示它们具有相似的主要抗原决定簇, 这些抗原决定簇可能与抗真菌活性无关。同系物之间抗真菌活性的差异可能来源于某些细微结构上的差异。

关键词: 黑腹果蝇; 抗真菌肽; Drosomycin; 同系物; 免疫原性; 抗真菌活性

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)06-0887-08

Antifungal activity and the immunogenicity of antifungal peptide Drosomycin and its isoforms from *Drosophila melanogaster*

YANG Wan-Ying¹, LIU Wen-Quan¹, DENG Xiao-Juan¹, DUAN Yun¹, HUANG Ya-Dong², WEN Shuo-Yang³, XIA Qing-You⁴, CAO Yang^{1,*} (1. Department of Sericulture Science, College of Animal Science, South China of Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Biopharmaceutical Research and Development Center, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Department of Entomology, College of Natural Resource and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 4. Key Sericultural Laboratory of Agriculture Ministry, College of Sericulture and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: In order to analyze the antifungal activity and immunogenicity of antifungal peptide Drosomycin (Drs) and its isoforms, Drs-1C and Drs-1E, from *Drosophila melanogaster*, their antibodies were prepared by two ways. In the first way, Drs, Drs-1C and Drs-1E were respectively fused with *afgf* gene. In the second way, Drs and Drs-1E were respectively linked into multi-copy genes of Drs and Drs-1E tandem in the same direction. The recombinant plasmids pET-afgf-Drs, pET-afgf-C and pET-afgf-E were constructed through the first way, while pRSET-2Drs, -4Drs, -6Drs and pRSET-2E, -4E, -6E were constructed through the second way. They were then transformed into *E. coli* BL21(DE3)_{plys}S. After purification, the fused proteins afgf-Drs, afgf-C, afgf-E and the concatamer proteins of 4 Drs, 4 Drs-1E were used for preparation of the antisera by immunizing mice. The results of Western-blot immunogenicity showed that Drs and its isoforms had strong antigen immune reactions with their according antisera. Cross-reactions between them were also found.

基金项目: 国家重点基础研究发展规划“973”项目(2005CB121000); 广东省自然科学基金项目(010294, 032256, 04020553); 广东省科学技术计划重点项目(2003C104042)

作者简介: 杨婉莹, 女, 1977年生, 博士, 从事昆虫分子生物学研究, E-mail: ywyrose@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: caoyang@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2005-12-28; 接受日期 Accepted: 2006-07-31

These results suggested that they might have the similar main antigen sites. We so inferred that there is no relationship between the main antigen sites and activity sites. The small difference of their structures may be the main mechanism causing the functional divergence of their antifungal activity.

Key words: *Drosophila melanogaster*; antifungal peptide; Drosomycin; isoforms; immunogenicity; antifungal activity

Fehlbaum 等(1994)从黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 分离的 Drosomycin (Drs) 是第 1 个被鉴定的昆虫抗真菌肽(insect antifungal peptide)因子,它对细菌、酵母菌无明显的抗性,但对多种丝状真菌(filamentous fungi)显示强的抗性(Fehlbaum *et al.*, 1994; Michaut *et al.*, 1996)。Adams 等(2000)完成了对黑腹果蝇基因组的测序和框图绘制, Khush 和 Lemaitre (2000)由此发现在黑腹果蝇基因组中除了 Drs 基因 (*Drs*) 外, 还有另外 6 条变异的 Drs 同系物(isoforms)基因序列。这些 Drs 同系物基因家族成员位于黑腹果蝇基因组 3L 染色体上的 3 个相邻的基因簇中。为了研究方便, Cao 等(2003)按它们的位置次序分别将其命名为 *Drs-1C* (AY225091)、*Drs-1D* (AY351397)、*Drs-1E* (AY351398)、*Drs-1F* (AY351399)、*Drs-1G* (AY351400) 和 *Drs-1H* (AY351402)。由这些 Drs 同系物基因家族成员推导出的 44 ~ 46 个氨基酸成熟肽序列, 与 Drs 的相似性变幅较大(65% ~ 97%), 但具有完全相同的氨基酸保守位点和由 8 个半胱氨酸(Cys)残基形成的 C₅S₃β 基序(cysteine stabilized alphabeta motif)结构。

同一种抗微生物肽在昆虫基因组中一般存在数目不等的同系物基因家族, 但是关于这些同系物基因是否存在抗菌活性差异的研究报道则较少。我们曾对 Drs 和它的 6 个同系物基因的克隆表达产物进行了功能鉴定, 显示它们存在明显的抗真菌活性的差异, 结合对它们变异位点的分析, 发现在 Drs 同系物的结构与功能的关系中, β 折叠结构内的氨基酸和 α 螺旋以外的其他氨基酸可能对抗真菌活性至关重要(Yang *et al.*, 2006)。在前文研究的基础上, 我们进一步检测 Drs 同系物之间的免疫原反应, 希望由此揭示它们是否具有相似的空间构象和共同的主要抗原决定簇, 以及这些主要抗原决定簇与其抗真菌活性差异的关系。

黑腹果蝇 Drs 及其同系物的分子量较小, 仅由 40 ~ 44 个氨基酸残基组成, 本身不具有免疫原性, 只能作为半抗原(Hames and Glover, 1996), 需要加大 Drs 及其同系物的分子量以增加它们的免疫原性。另外, 在 Drs 及其 6 个同系物之间, Drs、Drs-1C 与 Drs-

1E 彼此间成熟肽序列的相似性差异较大(Drs/Drs-1C: 72%; Drs/Drs-1E: 65%; Drs-1C/Drs-1E: 56%), 因此本研究选择同系物基因 *Drs*、*Drs-1C* 和 *Drs-1E* 分别与细胞生长因子基因 *afgf* 融合表达制作抗体的方法(庞实锋等, 2003)和构建基因同向串联表达制作抗体的方法(黎庶等, 2003)进行免疫原性检测。

1 材料与方法

1.1 供试菌种和质粒

表达质粒载体 pRSET A 由华南农业大学动物科学学院曹永长教授赠送。pET-3C-afgf 质粒和宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) plysS 由暨南大学医药生物技术研究开发中心保存。*E. coli* DH5α 菌株和 pET-Drs、pET-C、pET-E 质粒由华南农业大学动物科学学院蚕丝科学系生物技术实验室保存。pGEM[®]-T 载体质粒为 Promega 公司产品, pET-3C 质粒为 Novagen 公司产品。7 周龄普通级的昆明小白鼠购自广州中山大学实验动物中心。

1.2 酶类及其他试剂

限制性内切酶 *Hind* III、*Sac* I、*Eco* R I、*Bam* H I、*Nde* I 和 T4 DNA 连接酶分别购自 TaKaRa 公司。E. Z. N. A 质粒抽提试剂盒和 E. Z. N. A PCR 产物回收试剂盒为 Omega 公司产品, QIAquick Gel Extraction Kit Protocol 为 Qiagen 公司产品。CM Sepharose[™] Fast Flow、肝素亲和层析凝胶为 Amersham 公司产品。预染的蛋白质分子量标准 Biolabs 购自基因公司。弗氏佐剂、底物 TMB 和酶标记的羊抗小鼠二抗购自华美生物工程公司。硝酸纤维素膜、DAB 显色液等分别购自 Promega 公司和鼎国生物科技有限公司。

1.3 *afgf-Drs*、*afgf-C* 和 *afgf-E* 融合基因的获得

由于 Drs 与 Drs-1C 两端核苷酸序列相同, 用 1 对特异引物 Drs1/Drs2 (GACTGCCATATGGACTGCC TGTCCGGAAGATA/GCCGGATCCTTAGCATCCTTCGCA CCAGCAC, 下划线分别为 *Nde* I 和 *Bam* H I 位点) 从本室构建的 pET-Drs 和 pET-C 重组表达质粒进行 PCR 扩增获得 Drs 和 Drs-1C 基因, 由 Drs-E1/Drs-E3 (GCCCATCATATGGATTGCCTATCTGGAACCTTCGGAG

GTCCTTGCTGGGCCTGGAGTGGAGAAAAGTG/GCCCGGA
TCCTTAGCATCCTTCGCACCAGCACTTCATTGCGCCACT
GCAGTGTCCACTGACATGT,下划线分别为 *Nde* I 和
*Bam*H I 位点)从本室构建的 pET-E 重组表达质粒
进行 PCR 扩增获得 *Drs-IE* 基因。

用引物 *afgf1/afgf2* (GACTCAGCATATGGCTAACTA
CAAGAAGCCAAAG/ATCAGAAGAACTGGCAATGGC)
(下划线为 *Nde* I 位点)从 pET-3C-*afgf* 重组表达质粒
获得 *afgf* 基因。

PCR 扩增融合基因片段 *afgf-Drs* 和 *afgf-C* 的共
用中间嵌合引物为 *afgf-xa-Drs* (GCAGCGCCATTGCC
AGTTTCTTCTGAT **ATCGAAGGTCGC** GACTGCCTGTCC
GGAAGATA) 融合基因片段 *afgf-E* 的中间嵌合引物
afgf-xa-E (GCAGCGCCATTGCCAGTTTCTTCTGAT**ATCG
AAGGTCGC**GATTGCCTATCTGGAACCTTTCG) 作为融合
基因片段 *afgf-E* 的上游引物。由于 *Drs*、*Drs-IC* 和
Drs-IE 的下游序列完全相同,可以共用 *Drs-afgf*
(GACGGATCCTTAGCATCCTTCGCACCAGC) 作为 PCR
扩增 *afgf-Drs*、*afgf-C* 和 *afgf-E* 融合基因的下游引物
(引物序列中的斜体加粗部分为 *Xa* 切割因子位点,
下划线部分为 *Bam*H I 位点)。

1.4 用于同向串连的 *Drs* 和 *Drs-IE* 基因的获得

用特异引物 *Drs**1/*Drs**2 (CATGGATCCGACTGC
CTGTCCGGAAG/CATGAGCTCCGCATCCTTCGCACCA
G) 和特异引物 *Drs-IE**1/*Drs-IE**2 (CATGGATCCGATT
GCCTATCTGGAAC/CATGAGCTCCGCATCCTTCGCAC
CAG) (下划线分别为 *Bam*H I 和 *Sac* I 位点),分别
从本室已构建的 pET-*Drs* 和 pET-E 重组表达质粒进行
PCR 扩增获得 *Drs* 和 *Drs-IE*。

1.5 与 *afgf* 基因融合的重组表达质粒的获得

按 Sambrook 等(1992)的方法,将 PCR 扩增获得的
融合基因片段 *afgf-Drs*、*afgf-C* 和 *afgf-E* 用 E. Z.
N. A. Cycle-Pure Kit 纯化后克隆至 pGEM[®]-T 载体,测
序正确后分别酶切并与线性化的 pET-3C 表达载体
进行连接,转化 DH5 α 感受态细胞,经 PCR 鉴定、酶
切鉴定和测序鉴定后,获得重组表达质粒 pET-*afgf-
Drs*、pET-*afgf-C* 和 pET-*afgf-E*,分别转化表达宿主菌
BL21(DE3)*plysS*。

1.6 同向串连的 *Drs* 和 *Drs-IE* 基因重组表达质粒的构建

首先将 PCR 扩增获得的 *Drs* 或 *Drs-IE* 分别用
*Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切,与同样双酶切线性化的载
体 pRSET A 连接,转化 DH5 α 感受态细胞,进行重组
转化子的 PCR 筛选和酶切鉴定,获得含单拷贝基因

的重组表达质粒 pRSET-1*Drs* 和 pRSET-1*E*。

采用同尾酶的原理构建基因同向串连体(林澄
涛等,1999)。即利用同尾酶 *Bam*H I (识别序列为:
G * GATCC) 和 *Bgl* II (A * GATCT) 切割靶序列后可
形成相同粘性末端的特性,双酶切含单拷贝基因的
重组质粒和 pRSET A,酶切产物用 T4 连接酶连接
后,连接处的碱基序列变为 AGATCC,不再为二者所
识别。将含有单拷贝 *Drs* 或 *Drs-IE* 的 pRSET-1*Drs* 或
pRSET-1*E* 重组质粒进行两组酶切反应。第 1 组用
*Bam*H I 和 *Hin*d III 进行双酶切后回收小片段(分别
含单拷贝 *Drs* 或 *Drs-IE* 基因),第 2 组用 *Bgl* II 和
*Hin*d III 进行双酶切后回收大片段(分别含线性化的
pRSET-1*Drs* 或 pRSET-1*E* 质粒)。再将酶切后所得的
大、小片段用 T4 连接酶连接,即可得到同向串连的
双拷贝 *Drs* 或 *Drs-IE* 基因的重组表达质粒。按照此
原理分别获得 2、4、6 拷贝的 *Drs* 和 *Drs-IE* 基因的
重组表达质粒:pRSET-2*Drs*、-4*Drs*、-6*Drs* 和 pRSET-2*E*、
-4*E*、-6*E*。将上述含有多拷贝同向串连基因的重组
表达质粒 pRSET-4*Drs* 和 pRSET-4*E*、pRSET-6*Drs* 和
pRSET-6*E* 及空质粒 pRSET A 分别转化 BL21(DE3)
plysS 表达宿主菌。

1.7 融合基因在宿主菌中的诱导表达与纯化

挑取含有重组质粒 pET-*afgf-Drs*、pET-*afgf-C* 和
pET-*afgf-E* 的 BL21(DE3)*plysS* 单菌落进行培养,以
终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导,检测目的基因在不同
菌液起始浓度(OD_{600} 为 0.4 ~ 1.0)的表达。在 OD_{600}
= 0.9、IPTG 终浓度为 1 mmol/L 诱导 4 h 的培养条件
下,对表达产物进行可溶性分析。将上清液分别进行
CM Sepharose[™] Fast Flow 层析纯化、肝素亲和层析
纯化,最后用超滤离心管 Microcon YM-3(Membrane
NMWL 10 kD)进行脱盐及浓缩。对浓缩后的 3 种融
合蛋白分别用分光光度计测定蛋白含量。

1.8 同向串连基因在宿主菌中的诱导表达与纯化

对分别含 4、6 拷贝 *Drs*、*Drs-IE* 基因的 BL21
(DE3)*plysS* 重组菌进行 OD_{600} 为 0.5 ~ 0.7、终浓度为
1 mmol/L IPTG 的诱导表达检测,选定 OD_{600} = 0.6、
IPTG 终浓度为 1 mmol/L 诱导 4.5 h 的培养条件,对
其表达产物进行可溶性分析。按 Cerletti 等(1991)
的专利方法对沉淀中的包涵体分别用包涵体洗涤液
I (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 5 mmol/L EDTA, 1 mol/
L NaCl, 0.5% Triton X-100, 5% 甘油)、包涵体洗涤液
II (5 mmol/L EDTA, 0.1 mol/L NaCl, 0.1 mol/L HAc, 3
mol/L 尿素)、包涵体洗涤液 III (5 mmol/L EDTA, 0.1
mol/L NaCl, 0.1 mol/L HAc, 4 mol/L 尿素)进行洗涤离

心,然后用包涵体溶解液(100 mmol/L KH_2PO_4 , 10 mmol/L Tris-HCl, 8 mol/L 尿素, 50 mmol/L DTT)溶解沉淀后,进行超滤离心,脱盐及浓缩等纯化处理,并用分光光度计测定蛋白含量。

1.9 免疫血清的制备和 Western blotting 检测

1.9.1 抗血清的制备

首先分别以 1 份免疫佐剂:1 份抗原,在研钵中制备乳化的弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂。用此疫苗对饲养 2~3 天的已适应环境后的 7 周龄普通级昆明小白鼠(SPF 级,18~22 g)进行后大腿肌肉和皮下免疫注射。免疫时随机分组小白鼠,每组 6 只小白鼠,其中一组为生理盐水对照组,另外 4 组分别为 *afgf-Drs* 融合蛋白、*afgf-C* 融合蛋白、4-*Drs* 蛋白和 4-*Drs-IE* 蛋白处理组。分 3 次免疫:第 1 次注射弗氏完全佐剂的蛋白疫苗,*afgf-Drs* 和 *afgf-C* 融合蛋白剂量为 10 μg /只,4-*Drs* 和 4-*Drs-IE* 蛋白为 5 μg /只;第 2 次和第 3 次注射弗氏不完全佐剂的蛋白疫苗,*afgf-Drs* 和 *afgf-C* 融合蛋白剂量均为 10 μg /只,4-*Drs* 和 4-*Drs-IE* 蛋白第 2 次注射量为 7.5 μg /只,第 3 次注射量为 10 μg /只。第 1 次的免疫时间为 1 天,第 2 次为 14 天,第 3 次为 35 天。根据小白鼠免疫后的健康情况,可以在第 3 次免疫 14 天后,再进行不加佐剂的第 4 次免疫。对照组与免疫处理组处理相同。在第 3 次免疫后的 56 天或第 4 次免疫后的 14 天,将免疫后的小白鼠眼眶放血,于 4 $^{\circ}\text{C}$, 3 000 r/min 离心 5 min,收集血清加 0.01% 叠氮钠, -70 $^{\circ}\text{C}$ 下备用。

1.9.2 Western blotting 检测

取适量的供试 *afgf-Drs* 和 *afgf-C* 融合蛋白、4-*Drs* 和 4-*Drs-IE* 蛋白(浓度为 11.3~113 $\mu\text{g}/\text{mL}$)样品,分别与等体积的 2 倍上样缓冲液混合,沸水中加热变性 5 min,取 20 μL 分别在胶的两边对等点样进行 SDS-PAGE,电泳结束后将胶切开,一半进行电泳染色,另一半进行 Western blotting 检测。

按 Sambrook 等(1992)的方法,将电泳凝胶转移至硝酸纤维素膜、进行封闭、漂洗后,再转移至 5 mL 以 1:100 稀释于 1% 脱脂奶粉/TBS 中的一抗样品(抗血清样品)进行第 1 次温育反应(25 $^{\circ}\text{C}$ 、1 h)。然后将硝酸纤维素膜换至 5 mL 以 1:50 稀释于 1% 脱脂奶粉/TBS 中的二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠)中进行第 2 次温育反应(25 $^{\circ}\text{C}$ 、1 h)。反应完成后,用 TBS 漂洗液漂洗纤维膜 3 次,每次漂洗时间 10 min。然后加入底物显色液显色,并与染色的胶片一起拍照。

2 结果与分析

2.1 融合蛋白基因重组表达载体的构建

按照 2 步 PCR 法,将 *afgf* 基因分别与 *Drs*、*Drs-IE* 和 *Drs-IE* 基因进行 PCR 互补扩增,合成 3 个融合基因片段 *afgf-Drs*、*afgf-C* 和 *afgf-E*。

细胞生长因子基因 *afgf* 序列长约 400 bp,*Drs*、*Drs-IE* 和 *Drs-IE* 基因加酶切位点约 150 bp 左右,所得的 3 个融合基因的长度应为 550 bp 左右(图 1),将克隆至 pGEM⁺-T 载体上并测序正确的 *afgf-Drs*、*afgf-C* 和 *afgf-E* 融合基因片段分别酶切,并克隆至表达载体 pET-3C 中,经酶切鉴定和测序鉴定后,构建成重组表达质粒 pET-*afgf-Drs*、pET-*afgf-C*、pET-*afgf-E* 3 个重组表达质粒的双酶切鉴定结果如图 2 所示。

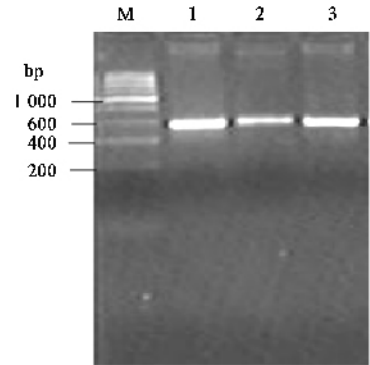


图 1 双价融合基因的 PCR 鉴定结果

Fig. 1 PCR analysis of binary fusion genes
M: 200 bp marker; 1: *afgf-Drs*; 2: *afgf-C*; 3: *afgf-E*.

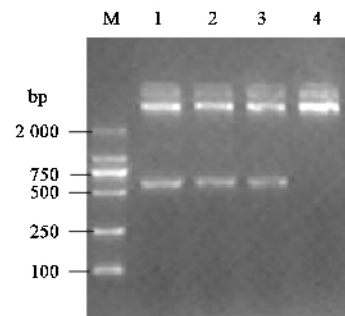


图 2 融合基因重组表达载体的酶切鉴定

Fig. 2 Analysis of the digestion of the recombinant vectors of the fusion genes
M: DNA DL2000 marker; 1: pET-*afgf-Drs*; 2: pET-*afgf-C*; 3: pET-*afgf-E*; 4: pET-3C.

2.2 同向串连基因重组表达载体的构建

采用 PCR 扩增方法,以特异引物 $\text{Drs}^* 1/\text{Drs}^* 2$

和 Drs-1E* 1/Drs-1E* 2 分别从 pET-Drs 和 pET-1E 质粒中扩增获得两端含有 *Bam*H I 和 *Sac* I 位点 Drs 和 Drs-1E 基因,按照图 3 所示的含有 2 个 Drs 同向拷贝的重组质粒构建方法,构建成重组表达质粒 pRSET-1Drs、-2Drs、-4Drs 和 -6Drs 以及 pRSET-1E、2E、4E 和 -6E。对 pRSET-1Drs、-2Drs、-4Drs、-6Drs 分别用内切酶 *Bam*H I 与 *Sac* I 或 *Hind* III 进行双酶切鉴定(图 4)。

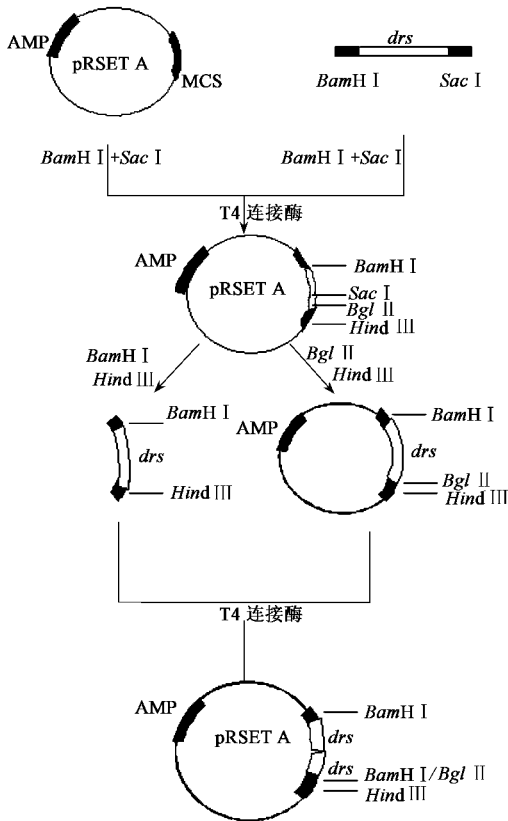


图 3 含有 2 个 Drs 拷贝的重组质粒的构建示意图

Fig. 3 Construction of the recombinant plasmid with 2 repeats of Drs

2.3 融合蛋白的诱导表达与纯化

按选定的 $OD_{600} = 0.9$ 、IPTG 终浓度为 1 mmol/L 诱导 4 h 的培养条件,对分别含有重组表达质粒 pET-afgf-Drs、pET-afgf-C、pET-afgf-E 的 BL21(DE3)plysS 宿主菌进行诱导表达。对其表达产物的可溶性分析表明,3 种融合蛋白主要以可溶形式表达于上清液中,也有部分以包涵体形式表达于沉淀中。图 5 为 pET-afgf-Drs 的可溶性分析结果。分别用 CM Sepharose™ Fast Flow 和肝素亲和层析纯化,最后用超滤离心管进行脱盐及浓缩,如此 3 种融合蛋白得到了较好的纯化。融合蛋白 afgf-Drs 纯化后的 Tricine-SDS-PAGE 检测结果如图 6 所示。

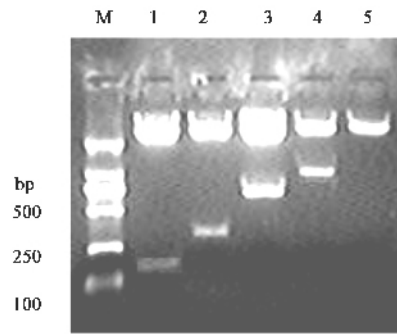


图 4 Drs 基因及其多拷贝串连体重组质粒的酶切鉴定

Fig. 4 Digestion analysis of the recombinant plasmids of Drs and its multi-repeats

M: DNA DL2000 marker; 1: pRSET-1Drs; 2: pRSET-2Drs; 3: pRSET-4Drs; 4: pRSET-6Drs; 5: pRSET A.

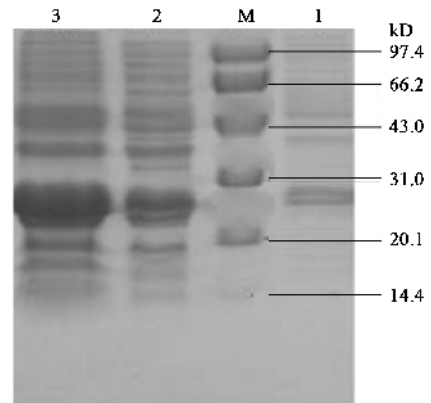


图 5 afgf-Drs 表达产物的可溶性分析

Fig. 5 Analysis of the solubility of the expressed products of afgf-Drs

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 含 pET-3C 质粒细菌裂解物 Pieces of the crashed cell with pET-3C; 2: 含 pET-afgf-Drs 质粒细菌裂解物沉淀 Deposits of the crashed cell with pET-afgf-Drs; 3: 含 pET-afgf-Drs 细菌裂解物上清液 Supernatant of the crashed cell with pET-afgf-Drs. 箭头指示处为 afgf-Drs 融合蛋白泳带 Arrowhead represents the band of the fusion protein, afgf-Drs.

2.4 同向串连蛋白的诱导表达与纯化

将重组表达质粒 pRSET-4Drs 和 -6Drs 以及重组质粒 pRSET-2E、-4E 和 -6E 转化到 BL21(DE3)plysS 受体菌中,用选定的 $OD_{600} = 0.6$ 、IPTG 终浓度 1 mmol/L 诱导表达 4.5 h。SDS-PAGE 检测结果(图 7)表明这些同向串连的多拷贝 Drs 和 Drs-1E 分别表达出 1 条大小各约为 26.5 kD 和 36.5 kD 的目的蛋白带,其中 4 拷贝串连基因的表达量最高。图 8 显示这些串连表达的蛋白主要以包涵体形式存在,分别用包涵体洗涤液 I、II 和 III 对包涵体蛋白进行洗涤后,用包涵体溶解液溶解包涵体,最后用超滤离心管进行脱盐及浓缩等纯化,可获得较纯的 4 拷贝串连

表达的 Drs 和 Drs-IE 蛋白。

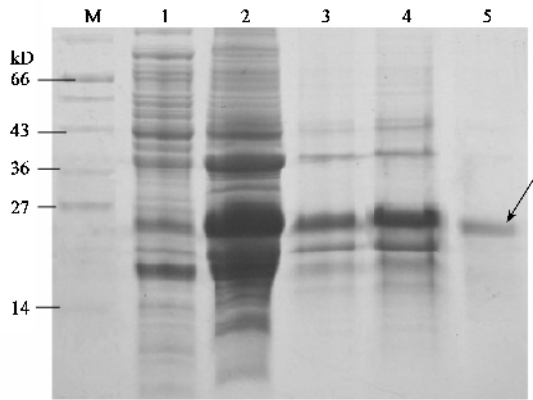


图 6 融合蛋白 afgf-Drs 的纯化

Fig. 6 Purification of the fusion protein, afgf-Drs

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 含 pET-3C 质粒细菌裂解物 Pieces of the crashed cell with pET-3C; 2: 含 pET-afgf-Drs 细菌裂解物上清液 Supernate of the crashed cell with pET-afgf-Drs; 3, 4: 经阳离子交换层析洗脱的泳带 Washed bands with cationic exchange; 5: 经肝素亲和层析洗脱的泳带 Washed bands with heparin affinity chromatography. 箭头指示处为纯化的 afgf-Drs 融合蛋白泳带 Arrowhead represents the band of the purified fusion protein, afgf-Drs.

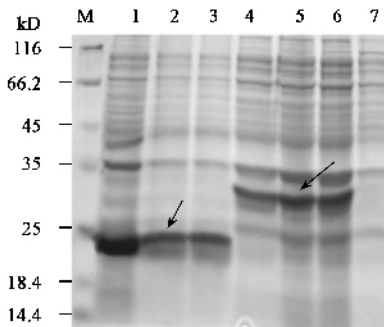


图 7 多拷贝 Drs 蛋白的诱导表达

Fig. 7 Induced expression of the fusion protein of Drs multi-repeats

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1-3: 4 拷贝的 Drs 蛋白 Proteins of 4 Drs repeats; 4-6: 6 拷贝的 Drs 蛋白 Proteins of 6 Drs repeats; 7: pRSET A 的表达产物 Expressed products of pRSET A. 箭头指示处为目的蛋白 Arrowhead represents the target protein.

2.5 Western blotting 免疫原性检测

分别选取融合蛋白 pET-afgf-Drs 和 pET-afgf-C 为抗原, 以空载体 pET-3C 转化的细菌表达产物为对照, 进行 Tricine-SDS-PAGE 转移至硝酸纤维膜上, 对从免疫小白鼠获得的 3 种 afgf-Drs、afgf-C 和 afgf-E 抗血清进行 Western blotting 免疫原性检测。结果显示 3 种融合蛋白的抗血清均与各自的抗原有很强的免疫反应, 表明抗体制备成功, 但它们各自与另外两种同

系物的抗原也有交叉免疫反应(图 9)。以 Western blotting 检测 Drs 和 Drs-IE 同向串连蛋白抗血清的免疫原性结果同样表明, 它们对各自的 Drs 和 Drs-IE 抗原有很强的免疫反应, 但也有交叉免疫反应(图 10, 11)。

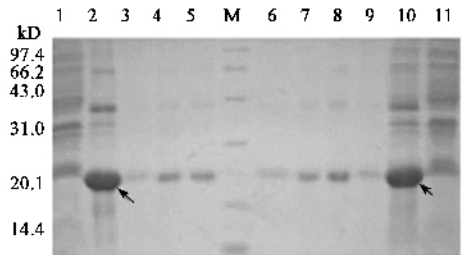


图 8 4 拷贝 Drs 和 4 拷贝 Drs-IE 包涵体蛋白的纯化

Fig. 8 Purification of the inclusion bodies of 4 Drs

repeats and 4 Drs-IE repeats, respectively

1, 11: pRSET对照 pRSET control; 2, 10: 分别为纯化前的 pRSET-4Drs 和 pRSET-4E 的表达产物 Expressed products of pRSET-4Drs and pRSET-4E before being purified, respectively; 3-5: 分别为经洗涤液 I、II 和 III 洗涤后的 4 拷贝 Drs 包涵体蛋白 Inclusion bodies of 4 Drs repeats washed with wash buffer I, II and III, respectively; 6, 9: 经洗涤液 III 洗涤后的 4 拷贝 Drs-IE 包涵体蛋白 Inclusion bodies of 4 Drs-IE repeats washed with wash buffer III; 7, 8: 分别为经洗涤液 I 和 II 洗涤后的 4 拷贝 Drs-IE 包涵体蛋白 Inclusion bodies of 4 Drs-IE repeats washed with wash buffer I, II, respectively. 箭头指示处为目的蛋白 Arrowhead represents the target protein.

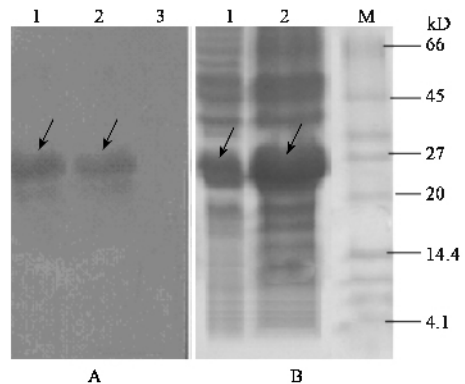


图 9 afgf-C 抗血清分别对抗原蛋白 afgf-Drs 和 afgf-E 的免疫原性

Fig. 9 Western blotting of afgf-C antiserum to afgf-Drs and afgf-E antigen protein, respectively

A: Western blotting. 1: afgf-Drs 抗原/afgf-C 抗血清 afgf-Drs antigen/afgf-C antiserum; 2: afgf-E 抗原/afgf-C 抗血清 afgf-E antigen/afgf-C antiserum; 3: pET-3C 表达产物/afgf-C 抗血清 Expression products of the pET-3C/afgf-C antiserum. B: Tricine-SDS-PAGE. M: 低分子量蛋白标准 Low molecular weight standard of the protein; 1: afgf-Drs 融合蛋白 afgf-Drs fusion protein; 2: afgf-C 融合蛋白 afgf-C fusion protein. 箭头指示为免疫原蛋白位置 Arrowhead indicates the locus of the immune position.

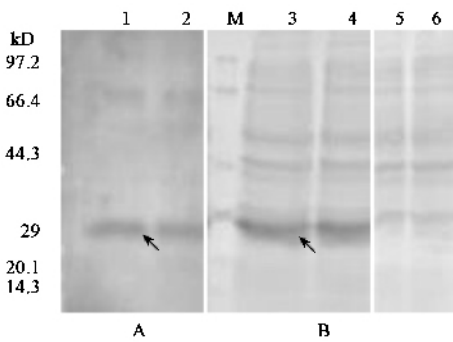


图 10 4 拷贝 Drs 抗血清分别与 4 拷贝 Drs、4 拷贝 Drs-IE 抗原蛋白的免疫原性

Fig. 10 Western blotting of the antiserum of 4 Drs repeats to the antigen protein of 4 Drs repeats and 4 Drs-IE repeats, respectively A: Western blotting. 1: 4 拷贝 Drs 抗血清/4 拷贝 Drs 抗原 4 Drs repeats antiserum/4 Drs repeats antigen; 2: 4 拷贝 Drs 抗血清/4 拷贝 Drs-IE 抗原 4 Drs repeats antiserum/4 Drs-IE repeats antigen. B: Tricine-SDS-PAGE. M: 低分子量蛋白标准 Low molecular weight standard of the protein; 3: 4 拷贝 Drs 抗原 4 Drs repeats antigen; 4: 4 拷贝 Drs-IE 抗原 4 Drs-IE repeats antigen; 5, 6: pRSET 表达产物 Expression products of pRSET. 箭头指示为免疫原蛋白位置 Arrowhead indicates the locus of the immune position.

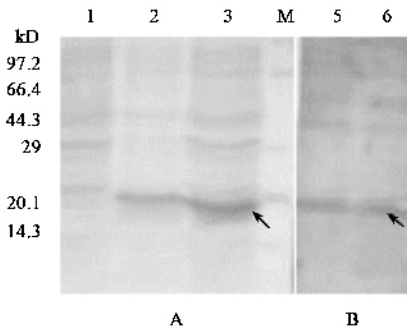


图 11 4 拷贝 Drs-IE 抗血清分别与 4 拷贝 Drs、4 拷贝 Drs-IE 抗原蛋白的免疫原性

Fig. 11 Western blotting of the antiserum of 4 Drs-IE repeats to the antigen protein of 4 Drs repeats and 4 Drs-IE repeats, respectively

A: Tricine-SDS-PAGE. M: 低分子量蛋白标准 Low molecular weight standard of the protein; 1: pRSET 表达产物 Expression products of pRSET; 2: 4 拷贝 Drs-IE 抗原 4 Drs-IE repeats antigen; 3: 4 拷贝 Drs 抗原 4 Drs repeats antigen. B: Western blotting. 5: 4 拷贝 Drs-IE 抗血清/4 拷贝 Drs-IE 抗原 4 Drs-IE repeats antiserum/4 Drs-IE repeats antigen; 6: 4 拷贝 Drs-IE 抗血清/4 拷贝 Drs 抗原 4 Drs-IE repeats antiserum/4 Drs repeats antigen. 箭头指示为免疫原蛋白位置 Arrowhead indicates the locus of the immune position.

Western blotting 免疫原性检测结果表明,对黑腹果蝇抗真菌肽基因 *Drs* 及其同系物基因 *Drs-IC* 和 *Drs-IE*, 无论采取与细胞生长因子 *afgf* 基因融合表达, 还是采用基因同向串连表达, 由它们的表达产物

制备的抗血清均具有强的抗原免疫反应, 同时相互间也有交叉免疫反应。

3 讨论

Fehlbaum 等(1994)最早发现了黑腹果蝇的抗真菌肽因子 *Drs* 及其抗丝状真菌的特性; Michaut 等(1996)以及 Landon 等(1997)分别分析了 *Drs* 8 个 Cys 位点的二硫键排列特征及 *Drs* 水溶性蛋白分子的三维空间构象。但是有关 *Drs* 的抗真菌活性与其分子结构的关系, 特别是与抗性特征有关的关键氨基酸位点, 未见有明确的结论。

在黑腹果蝇基因组中, *Drs* 的另外 6 个同系物的成熟肽序列也为 44~46 个氨基酸, 尽管这些序列的相似性差异较大, 但它们与 *Drs* 共有 23 个保守的氨基酸位点, 其中有 8 个 Cys 位点参与 $CS\alpha\beta$ 基序结构的形成(图 12)。那么黑腹果蝇的这些 *Drs* 同系物之间是否存在抗真菌活性的功能差异? 这些功能差异又与哪些氨基酸位点或其分子结构上的差异有关? 有必要对它们进行抗真菌活性差异的功能鉴定, 分析它们抗原决定簇的相似性或差异性, 以揭示这些 *Drs* 同系物的分子结构和功能的关系。

Yang 等(2006)克隆表达了 *Drs* 及其 6 个同系物基因, 检测了它们的表达产物对供试的长柄链格孢菌 *Alternaria longipe* 等 7 种植物病原真菌的抗真菌活性差异, 结果发现 *Drs* 对所有供试的植物病原真菌有强的抑杀作用, *Drs-IC* 和 *Drs-ID* 的抗菌谱较宽, *Drs-IG*、*Drs-IE* 和 *Drs-IF* 的抗菌谱依次变窄, *Drs-II* 则完全丧失抗性。对照 *Drs* 的氨基酸序列(Fehlbaum *et al.*, 1994)和它具有 $CS\alpha\beta$ 基序的三维分子结构(Michaut *et al.*, 1996; Landon *et al.*, 1997), 进一步分析发现, 在丧失部分抗菌活性的 *Drs-IE*、*Drs-IF* 和 *Drs-IG* 以及完全丧失抗菌活性的 *Drs-II* 中的 β 折叠结构中都有变异位点的发生, 而在抗菌谱较宽的 *Drs-IC* 和 *Drs-ID* 的 β 折叠结构中则没有发生变异位点; 另外, 完全丧失抗性的 *Drs-II* 与其他 6 个同系物相比在其成熟肽 α 螺旋和 β 折叠之外的第 29 位和 30 位之间插入了 R(Arg, 精氨酸)和 V(Val, 缬氨酸) 2 个变异位点(图 12)。这些变异位点与其抗性差异的内在关系, 可能暗示了 β 折叠结构内的氨基酸和 α 螺旋以外的其他氨基酸对它们的抗菌活性差异至关重要(Yang *et al.*, 2006)。

在 *Drs* 和它的 6 个同系物中, *Drs-IC* 和 *Drs-IE* 与 *Drs* 的成熟肽之间的序列差异最大, 尽管如此, 本实

