

研究简报

重组人 防御素 3 在大肠杆菌中的表达和活性分析

李春丽^{1),3)}, 阮 晖¹⁾, 陈正华²⁾, 陈其新²⁾, 何国庆¹⁾*

¹⁾ 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 杭州 310029; ²⁾ 甘肃亚盛集团博士后科研工作站北京分站, 北京 100101;

³⁾ 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002

Expression of Recombinant Human α -Defensin 3 in *E. coli* and Its Antimicrobial Activity Analysis

LI Chun-Li^{1),3)}, RUAN Hui¹⁾, CHEN Zheng-Hua²⁾, CHEN Qi-Xin²⁾, HE Guo-Qing¹⁾*

¹⁾ College of Biosystem Engineering & Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

²⁾ Beijing Branch of Postdoctoral Workstation of Gansu Yasheng Group Company, Beijing 100101, China;

³⁾ College of Animal and Veterinary Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract Human α -defensin 3 (hBD₃) is a short polypeptide with a wide range of antimicrobial activity, which was purified from human lesional psoriatic scales in 2001. To obtain high level expression in *E. coli* of α -defensin 3, four pairs of oligonucleotide with cosmic site were synthesised using *E. coli* biased codons according to the amino acid sequence of α -defensin 3, connected and amplified by PCR. The PCR product encoding human α -defensin 3 was cloned into pET30a vector. The recombinant vector was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) PlysS and the expression was induced by IPTG. The recombinant fusion protein was analyzed by SDS-PAGE and purified by affinity column. The mass of the fusion protein consisted of 30.9% in total bacteria proteins. The recombinant fusion protein was digested by enterokinase, resulting in the recombinant hBD₃. Antimicrobial activity analysis showed that both recombinant hBD₃ fusion protein and recombinant hBD₃ had similar potency as the native protein in suppressing growth of both gram positive bacteria *S. aureus* and gram negative one *E. coli* in a dose dependent manner.

Key words α -defensin 3, molecular cloning, recombinant expression, activity analysis
中图分类号 Q78

防御素是生物界广泛分布的一类低分子短肽, 具有广谱高效的杀菌、抗肿瘤作用, 并且不易使微生物产生抗药性, 具有很高的应用价值, 其中最引人注目的是 防御素^[1,2]. 人 防御素 3 (human α -defensin 3, hBD₃) 是最近发现的第 3 种人源性 防御素, 与其它人防御素相比, 在抗菌活性等方面具有明显优势, 是所有防御素中抗菌能力最强之一^[3~7], 具有独特的研究和开发价值. 为了得到高效表达 hBD₃ 的工程菌株, 本实验按照细菌对密码子的偏爱, 人工合成了 hBD₃ 的寡核苷酸片段, 构建了其表达载体. 经 IPTG 诱导、分离纯化和肠激酶切割, 得到了与天然 hBD₃ 活性基本相同的重组 hBD₃ 融合蛋白和重组 hBD₃. 为进一步的研究和开发打下基础.

1 材料与方法

1.1 材料

4 对编码 hBD₃ 的寡聚核苷酸片段和 1 对引物均由上海生物工程公司合成. pUCmrT 载体购自上海生物工程公司. pET30a 载体和 TG₁、BL21 (DE3) PlysS 菌株均为本试验室保存.

T4 DNA 连接酶、T4 多核苷酸激酶、限制性内切酶 *EcoR*、*Not*、*EX Taq* 酶购自大连宝生物工程公司. Recombinant Enterokinase kits 购自 Novagen

收稿日期: 2004-11-19, 接收日期: 2005-02-28

浙江省自然科学基金资助项目 (No. Y204348, No. 300024)

* 联系人 Tel: 0571-86971166, Fax: 0571-86971166

E-mail: gqhe@zju.edu.cn

Received: November 19, 2004; Accepted: February 28, 2005

Supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. Y204348, No. 300024)

* Corresponding author Tel: 0571-86971166, Fax: 0571-86971166

E-mail: gqhe@zju.edu.cn

公司. PCR 纯化试剂盒购自赛百胜公司. Ni^{2+} 亲和层析柱和 AKTA™ Prime 蛋白纯化系统购自 Amersham 公司. 多功能荧光分析系统购自美国冷泉港仪器公司. 冷冻干燥系统购自 Labconco 公司. 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 hBD₃ 基因的获得 根据 hBD₃ 的氨基酸序列^[6]和细菌对密码子的偏爱性^[8],设计合成了 4 对末端具粘合位点的寡聚核苷酸片段,寡聚核苷酸长度为 30~59 nt 不等,正负链之间互补区至少 25 nt 以上. 结构基因的两端分别设置了酶切位点 *EcoR* 和 *Not*,在 3' 端设计了两个终止密码子. 合成的片段经 T4 多核苷酸激酶磷酸化、T4 DNA 连接酶连接、PCR 扩增得到编码 hBD₃ 成熟后的目的片段.

1.2.2 基因的克隆 纯化的目的片段与 pUCmT 载体连接,经蓝白斑筛选,PCR 和酶切检测获得重组质粒 pUCmT-hBD₃. 重组质粒测序由上海生物工程公司完成. 将目的片段自 pUCmT-hBD₃ 酶切回收,与载体 pET30a 连接,进行 PCR 和酶切鉴定获得表达载体 pET-hBD₃.

1.2.3 诱导表达及电泳检测 载体 pET30a 和 pET-hBD₃ 分别转化 BL21 (DE3) PlysS,按照文献[9]报道的方法进行诱导表达,SDS-PAGE 分析表达结果.

1.2.4 目的蛋白的纯化 按照 Amersham 的产品说明操作,提取包涵体后直接进行亲和层析,并在层析柱上复性. 纯化后的融合蛋白按照肠激酶试剂盒的说明进行酶切,释放的目的蛋白再次进行亲和层析后冷冻干燥.

1.2.5 目的蛋白的活性检测 参照文献[6]报道的方法,调整菌的浓度至 $10^3 \sim 10^5$,悬于 100 μl 含 1% LB 培养基的 10 mmol/L 的磷酸钠缓冲液中 (pH 7.4),内含不同量融合蛋白的防御素溶液和酶切纯化后的防御素溶液,37℃ 培养 3 h 后,涂布平板计活菌数.

2 结果

2.1 hBD₃ 基因的构建

合成的寡核苷酸片段经 PCR 扩增后,得到了约 160 bp 的 DNA 片段,与预期的目的片段大小相符,电泳结果见 Fig. 1.

2.2 pET-hBD₃ 的构建

载体 pUCmT-hBD₃ 和 pET-hBD₃ 进行 PCR 扩增均得到一条约 160 bp 的目的片段. 如 Fig. 2 和 Fig. 3

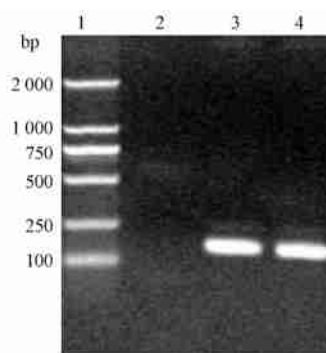


Fig. 1 PCR amplification from synthesized oligonucleotide
1:DNA Marker; 2:Control;
3,4:PCR product from synthesized oligonucleotide

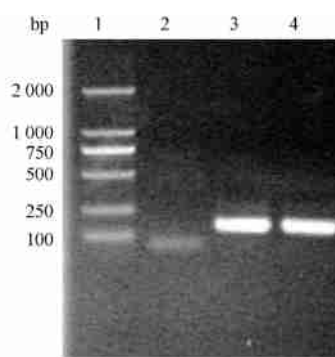


Fig. 2 Electrophoretogram of PCR product from pUCmT-hBD₃
1:DNA marker; 2:Control; 3,4:PCR product from pUCmT-hBD₃

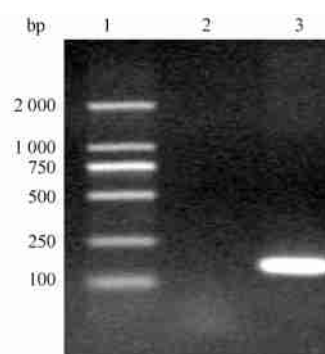


Fig. 3 Electrophoretogram of PCR product from pET-hBD₃
1:DNA marker; 2:Control; 3:PCR product from pET-hBD₃

所示,载体经 *EcoR* 和 *Not* 双酶切后也均得到一条约 160 bp 的片段,证明有约 160 bp 的外源片段插入到了质粒中. 测序结果进一步证实载体中的插入序列与设计的 hBD₃ 编码序列完全一致.

2.3 表达与检测

工程菌株在 30℃ 以 1 mmol/L IPTG 诱导 3~4 h 后,SDS-PAGE 结果如 Fig. 4 所示,在工程菌中明显比对照菌株和没有诱导的表达菌株多表达了一条大

小约为 16 kD 的蛋白,此为带有 His-Tag 的融合蛋白.表达量约占菌体总蛋白的 30.9%.

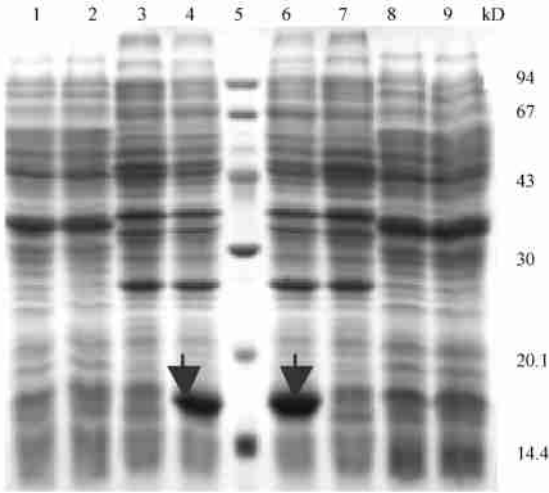


Fig. 4 SDS-PAGE analysis of BL21-pET hBD₃

- 1,9:BL21-pET30a culture after various time (3 hours,4 hours) ;
- 2,8:BL21-pET30a induction after various time (3 hours,4 hours) ;
- 3,7:BL21-pET hBD₃ culture after various time (3 hours,4 hours) ;
- 4,6:BL21-pET hBD₃ induction after various time (3 hours,4 hours) ,
- 5:Protein marker

2.4 目的蛋白的纯化

采用亲和层析的方法纯化目的蛋白,SDS-PAGE 显示得到了较为纯净的融合蛋白,如 Fig. 5 所示.以肠激酶酶切带 His-Tag 的融合蛋白,再次亲和层析以除去切下来的 His-Tag 和没有被酶切的融合蛋白,得到了约为 6 kD 的目的蛋白,如 Fig. 6 所示.

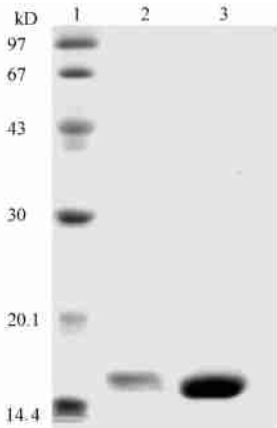


Fig. 5 SDS-PAGE analysis of pure recombinant hBD₃ fusion protein

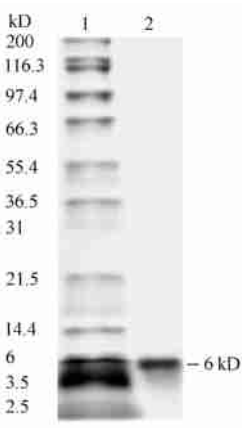


Fig. 6 SDS-PAGE analysis of pure recombinant hBD₃

2.5 目的蛋白的活性检测

带 His-Tag 的重组 hBD₃ 融合蛋白和酶切纯化的重组 hBD₃ 的体外抑菌实验结果如 Fig. 7 和 Fig. 8 所示.从图上可以看到,蛋白对革兰氏阳性菌(*S.*

aureus) 和革兰氏阴性菌(*E. coli*) 均有很强的抑菌活性,随着防御素浓度增加,细胞数量减少,与天然提取的 hBD₃ 活性基本一致^[6].

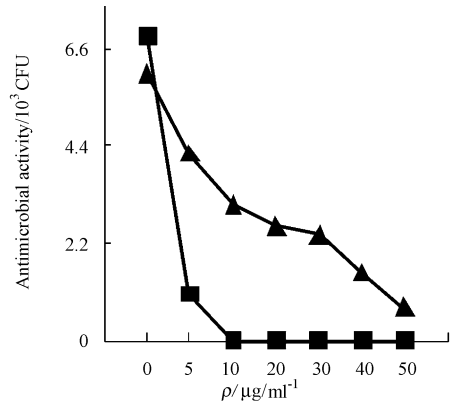


Fig. 7 Antimicrobial activity of recombinant hBD₃ fusion protein

- - *E. coli* ; - - *S. aureus*

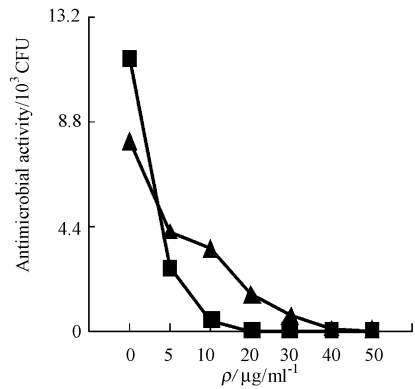


Fig. 8 Antimicrobial activity of recombinant hBD₃

- - *E. coli* ; - - *S. aureus*

3 讨论

抗菌肽重组表达普遍存在表达量和活性偏低的现象.原因很可能是真核基因在原核细胞中表达时,密码子使用频率不同^[8]. hBD₃ 基因序列中有一些大肠杆菌稀有密码,如编码 Arg 的密码子 AGA.如果直接使用 hBD₃ 天然序列在大肠杆菌中表达,则表达量很可能非常低.防御素对宿主细胞的毒性也会降低表达量.基于以上原因,我们采用大肠杆菌偏爱的密码子合成 hBD₃ 基因序列,如以 CGT 替代 AGA,并采取融合表达方式减少防御素对宿主细胞的伤害.结果显示,重组 hBD₃ 融合蛋白的表达量占菌体总蛋白的 30.9%,实现了 hBD₃ 在大肠杆菌中的高效表达.并且重组表达的 hBD₃ 和天然提取的 hBD₃ 抗菌活性基本一致^[6],说明本实验中采用的纯化、复性手段能

够切实可行地得到活性目的产物. 在表达菌株的选择上, 我们选用严格控制型菌株 BL21 (DE3) pLysS, 避免未诱导时的渗漏表达, 从而有效防止了 hBD₃ 对宿主细胞的伤害. 事实证明, 通过优化密码子、选用合适的纯化、复性手段与表达菌株可以得到高效表达的具有天然生物活性的 hBD₃.

本次实验所得到的 hBD₃ 融合蛋白与切去 His·Tag 的 hBD₃ 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均具有很高的生物活性, 这和陈姍等报导的 hBD₃ 融合蛋白对大肠杆菌没有抑菌活性不一致^[10], 也和 Harder 等报导的融合蛋白只有很弱抑菌活性的结果不一致^[6], 其具体原因还需要进一步分析. Hoover 曾报道, 去除 N 端 5 个氨基酸残基后 hBD₃ 仍有活性^[11]. 本实验中带有 His·Tag 的 hBD₃ 融合蛋白活性和去除 His·Tag 的 hBD₃ 活性没有很大差别, 这些结果是否说明 hBD₃ 的 N 端对于其活性确实并非必需, 或是影响有限, 尚需作进一步研究.

参考文献 (References)

- Hancock Robert E W. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis*, 2001, **11** (1): 156 ~ 164
- Periathamby A R, Andrew R D. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, **206**: 9 ~ 18
- Ganz T, Selsted M E, Szklarek D, Harwig S S, Daher K, Bainton D F, Lehrer R I. Defensins, Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*, 1985, **76** (4): 1427 ~ 1435
- Bensch K W, Raida M, Magert H J. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett*, 1995, **368**: 331
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder J M. A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 1997, **387**: 861
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder J M. Isolation and characterization of human α -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*, 2001, **276** (8): 5707 ~ 5713
- Garcia J R, Krause A, Schulz S, Rodriguez-Jimenez F J, Kluver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann W G. Human α -defensin-4: a novel inducible peptide with a special salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J*, 2001, **15**: 1819 ~ 1821
- Andersson S G E, Kurland C G. Codon preferences in free-living microorganisms. *Microbiol Rev*, 1990 (6): 198 ~ 210
- Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- 陈姍, 何凤田, 董燕麟, 李蓉芬, 高会广, 陈敏, 彭家和. 人防御素 3 融合蛋白在大肠杆菌中的表达、纯化和活性分析. *生物工程学报* (Chen Shan, He Feng-Tian, Dong Yan-Lin, Li Rong-Fen, Gao Hui-Guang, Chen Min, Peng Jia-He. The cloning, high level expression of human beta defensin 3 in *E. coli* and its antimicrobial activity analysis. *Chin J Biotechnol*), 2004, **20** (4): 490 ~ 495
- Hoover D M, Wu Z B, Tucker K, Lu W, Lubkowski J. Antimicrobial characterization of human α -defensin 3 derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, **47** (9): 2804 ~ 2809