

文章编号:1673-1689(2005)03-0034-05

仿生鲶鱼抗菌肽编码序列的设计及克隆

谢慧¹, 江龙法¹, 邬敏辰², 王武^{1*}

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 医学系, 江苏 无锡 214063)

摘要:人工合成的仿生鲶鱼抗菌肽 DNA 序列, 经聚合酶链式反应(PCR)扩增后得到带有不同限制性酶切位点的序列 XH1、XH2、XH3。将此基因克隆至载体 pGEX-5X-3, 成功构建了串联的重组质粒。测序验证后转化大肠杆菌 BL21(DE3), 37 °C IPTG 诱导, 获得高效表达, SDS-PAGE 扫描分析表明, 融合蛋白可达细菌全蛋白总量的 30%, 融合蛋白以包含体的形式存在于大肠杆菌细胞中。

关键词: 抗菌肽; 融合蛋白; 大肠杆菌; 表达

中图分类号: Q 785

文献标识码: A

Design and Cloning of an Emulated Sequence of Catfish *Parasilurus asotus* Antimicrobial Peptide

XIE Hui¹, JIANG Long-fa¹, WU Min-chen², WANG Wu^{1*}

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Department of Medicine, Southern Yangtze University, Wuxi 214063, China)

Abstract: Sequences XH1, XH2, XH3 coding for antimicrobial peptide with different restriction sites were obtained by PCR amplification, and then cloned into the fusion vector pGEX-5X-3. The recombinant with three sequence segments was constructed and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) after the expected sequences were checked. Induced by IPTG in 37 °C, the cloned protein expressed in a high level and reached about 30% of the total bacterial protein from desitometric scan analysis of SDS-PAGE. The fusion protein existed in *E. coli* cells was in the form of inclusion body.

Key words: antimicrobial peptide; fused protein; *E. coli*; expression

随着抗生素的普遍使用,许多病原菌的耐药性明显增强,对人类的健康造成严重威胁。近年研究发现,微生物、植物、动物及人体能产生具有抗菌能力的短肽类物质。由于独特的作用机理,它们具有

传统抗生素无法比拟的优越性,抗菌活性强、抗菌谱广、合成和杀菌速度快、不易诱导抗药菌株的产生,因此有望成为新一代的抗菌制剂^[1]。Kim 等人报道^[2],受伤鲶鱼 *Parasilurus asotus* 的上皮组织

收稿日期:2004-05-28; 修回日期:2004-09-17.

作者简介:谢慧(1979-),女,河南焦作人,生物化工硕士研究生。* 通讯作者

万方数据

分泌一种有广谱抗菌性却无溶血活性的抗菌肽—Parasin I,它是鲶鱼非特异性免疫系统的重要组成部分。研究发现,当鱼体受到损伤时,金属蛋白酶水解鲶鱼皮肤黏液中的前体蛋白 Procathepin D 产生 cathepin D,通过它可切断未酰化的组蛋白 H2A 中 Ser19-Arg20 间的肽键,产生 19 个氨基酸残基的 Parasin I,其中有 5 个 Lys,3 个 Arg,带有很强的正电性。CD 谱和二维核磁共振数据表明:Parasin I 包含 11%的 α -螺旋,33%的 β -折叠,56%不规则螺旋^[3]。由于抗菌肽 Parasin I 是组蛋白裂解产物,不可能通过 cDNA 方法从鲶鱼组织细胞中得到基因。作者采取仿真设计和人工合成的技术路线,得到所期望的仿生鲶鱼抗菌肽。

1 材料与方法

1.1 实验材料

表达载体 pGEX-5X-3,大肠杆菌菌株 Top10、BL21(DE3);由复旦大学生命科学学院黄伟达教授赠送。限制性内切酶 BamH I、EcoR I、Sal I、Not I、T4 DNA 连接酶、RNase;购自 Biolabs 和 TaKaRa 公司;Taq 酶:复旦大学制备;SDS-PAGE 所用试剂:购自 BIO-RAD 公司;DNA Marker:购自上海华舜公司;蛋白质 Marker:作者所在实验室自配;其余试剂均为进口或国产分析纯;PCR 引物与模板:由上海博亚公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 目的序列的 PCR 扩增 将人工合成的模板和引物稀释至 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,用 3 对引物分别对模板进行 PCR 扩增,反应体系 25 μL 。94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,退火至 40 $^{\circ}\text{C}$ 维持 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,循环 30 次后,72 $^{\circ}\text{C}$ 维持 5 min,并缓慢降温至 4 $^{\circ}\text{C}$ 。2 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物,割胶回收目的片段^[4]。以回收的目的片段为模板,在上述条件下进行 PCR,即可得到比较纯净的目的基因 XH1、XH2、XH3。

1.2.2 单串联体表达载体的构建 采用 BamH I/EcoR I 分别双酶切载体 pGEX-5X-3 和目的基因 XH1,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 3 h,分别于 1, 2 g/dL 的琼脂糖胶上电泳,割胶回收。加入 T4 DNA 连接酶,连接过夜,转入大肠杆菌菌株 Top10 中,涂布于 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨卞青霉素的 LB 培养平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,挑取单克隆子进行 PCR 鉴定,即得到单串联表达载体 pGEX-5X-3-XH1。

1.2.3 多串联体的构建 采用 EcoR I/Sal I 分别双酶切表达载体 pGEX-5X-3-XH1 和目的基因

XH2,连接后得到二串联的表达载体。再采用 Sal I/Not I 分别双酶切表达载体 pGEX-5X-3-XH1-XH2 和目的基因 XH3,最终可得到三串联的表达载体。

1.2.4 重组载体的验证 由于目的基因片段太小,酶切鉴定很难得到清晰的条带,所以利用载体 pGEX-5X-3 设计了一对相距 150 bp 的引物,分别以重组载体为模板,进行 PCR 扩增,鉴定目的基因是否插入。

引物 4:5'-ATCGGATCTGATCGAAGGTCG-3'
5'-CAGACAAGCTGTGACCGTCTC-3'

1.2.5 测序 将三串联表达载体送上海博亚公司测序。

1.2.6 融合蛋白质的相对分子质量鉴定 将测序正确的表达质粒 pGEX-5X-3-XH1-XH2-XH3 转入大肠杆菌 BL21(DE3)表达菌株中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,挑取正确的克隆接种至含氨卞青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 培养基中培养过夜,以体积分数 1% 接种到新鲜的培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$,200 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8;加入 IPTG(终浓度为 1.0 mmol/L),37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 5 h,菌液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 r/min 离心 10 min,去除上清液。将菌体溶解在 1 倍蛋白质电泳加样缓冲液中,振荡均匀,在沸水浴中煮 3~5 min,离心 10 min,吸取上清液到另一 Eppendorf 管,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[5] 鉴定。

2 结果与讨论

2.1 目的序列与相应引物的设计

根据韩国 Kim 实验室报道,Parasin I 的一级结构为: Lys-Gly-Arg-Gly-Lys-Gln-Gly-Gly-Lys-Val-Arg-Ala-Lys-Ala-Lys-Thr-Arg-Ser-Ser。根据抗菌肽的作用机理^[6]分析,Parasin I 的 C-端对其生理活性影响不大。为了便于表达产物的分离,将肽链 C 末端的丝氨酸换成甲硫氨酸,并在 N 端也加上一个甲硫氨酸,构成 BrCN 裂解位点^[7]。

在综合分析鲶鱼抗菌肽的序列特征的基础上,选择大肠杆菌偏爱密码子设计仿生抗菌肽的 DNA 序列。根据模板和载体的性质设计了 3 对带有不同限制性酶切位点的引物,具体序列如下:

引物 1:5'-CG GGA TCC CC ATG AAA GGT
BamHI
CGT GGC A-3'
5'-G GAATT C CG CAT AGA ACG
EcoRI
GGT CTT-3'
引物 2:5'-G GAA TTC C ATG AAA GGT
EcoRI

CGT GGC A-3'
5'-A CGC GTC GAC CAT AGA ACG
Sall

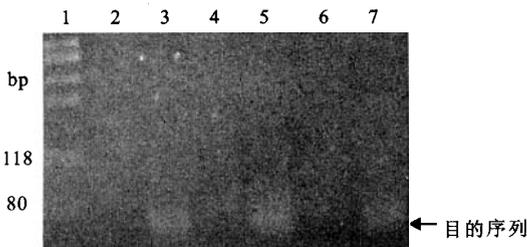
GGT CTT-3'
引物 3; 5'-A CGC GTC GAC ATG AAA GGT
Sall

CGT GGC A-3'
5'-ATAAGAAT GCGGCCGC CAT
NotI

AGA ACG GGT CTT-3'
模板: 5'-ATG AAA GGT CGT GGC AAA
CAA GGT GGC AAA GTT CGT GCG AAA GCG
AAG ACC CGT TCT AT-3'

2.2 序列 XH1、XH2、XH3 的 PCR 扩增结果

以人工设计和合成的仿真抗菌肽 DNA 序列为模板,用 3 对带有不同限制性酶切位点的引物分别将其扩增,得到目的序列 XH1、XH2、XH3,三段目的序列的理论长度分别为 78,78,80 bp. 电泳结果见图 1. 三条泳带的长度在 80 bp 左右,与理论长度相符.



1. DNA Marker; 2,4,6 分别为 XH1, XH2, XH3 的空白对照 (相应未加模板的 PCR 产物); 3. XH1; 5. XH2; 7. XH3

图 1 序列 XH1、XH2、XH3 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of sequences XH1, XH2, XH3

2.3 重组质粒的构建

利用基因工程表达短肽时,常遇到两种问题:1)产物在胞内容易被蛋白酶系水解;2)抗菌肽带有正电性,对宿主细胞有毒性,使得表达效率低.目前国内外解决该方法一般有 3 种:1)同向串联表达;2)以融合蛋白形式表达;3)串联上一段酸性片段.作者综合了以上 3 种方法,将 3 段目的基因依次串联在带有酸性氨基酸残基的 GST 融合蛋白后,不仅降低了其对细胞的毒性,并且跟单串联体比较,也提高了目的蛋白质在融合蛋白质中的比例,重组质粒构建过程见图 2.

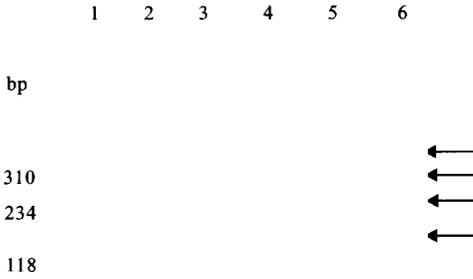
2.4 重组质粒的鉴定

用引物 4 扩增 3 个重组质粒,94 °C 预变性 4 min,退火温度设置在 52 °C,其他条件同目的序列扩增方法数据

泳,结果见图 3.一、二、三串联的 PCR 产物理论长度分别为 210,270,330 bp,各相差 60 bp,电泳图分析结果与理论值相符,说明目的序列已经插入到表达载体中.

图 2 重组质粒构建图

Fig. 2 Diagram for the construction of the recombinant plasmids



1. DNA Marker; 2. 不加模板的空白对照; 3. 模板为 pGEX-5X-3 的 PCR 产物 (150 bp); 4. 模板为 pGEX-5X-3-XH1 的 PCR 产物 (210 bp); 5. 模板为 pGEX-5X-3-XH1-XH2 的 PCR 产物 (270 bp); 6. 模板为 pGEX-5X-3-XH1-XH2-XH3 的 PCR 产物 (330 bp)

图 3 重组质粒 PCR 的电泳结果

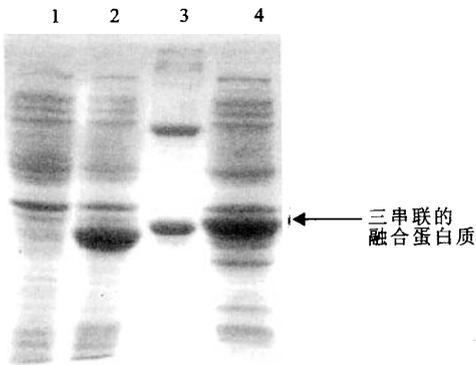
Fig. 3 Electrophoresis analysis of PCR products of recombinant plasmids

```

1   GATCTGATCGAAGGTCGTGGGATCCCCATGAAAGGTCGTGGCAAACAAGGTGGCAAAGTT
1'  D L I E G R G I P M K G R G K Q G G K V
61  CGTGCGAAAGCGAAGACCCGTTCTATGCGGAATTCCATGAAAGGTCGTGGCAAACAAGGT
21' R A K A K T R S M R N S M K G R G K Q G
121 GGCAAAGTTCGTGCGAAAGCGAAGACCCGTTCTATGGTCGACATGAAAGGTCGTGGCAAA
41' G K V R A K A K T R S M V D M K G R G K
181 CAAGGTGGCAAAGTTCGTGCGAAAGCGAAGACCCGTTCTATGGCGCCGCATCGTGA
61' Q G G K V R A K A K T R S M A A A S *
  
```

图 4 三片断的核苷酸序列与相应的氨基酸序列

Fig. 4 Nucleotide and deduced amino acid sequence of three sequence segments



1. 不加 IPTG 诱导; 2. 相对分子质量为 28 000 的蛋白质; 3. 蛋白质 marker (从下到上相对分子质量分别为 34 000, 68 000); 4. 加 IPTG 诱导的三串联融合蛋白质表达

图 5 重组质粒 pGEX-5X-3-XH1-XH2-XH3 在大肠杆菌 BL21 中的表达

Fig. 5 Expression of the recombinant plasmid pGEX-5X-3-XH1-XH2-XH3 in *Escherichia coli* BL21

2.7 融合蛋白质的存在形式

37 °C 摇瓶发酵得到菌体后,用 lysis buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0; 250 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA) 溶解菌体,加入适量溶菌酶,搅拌,

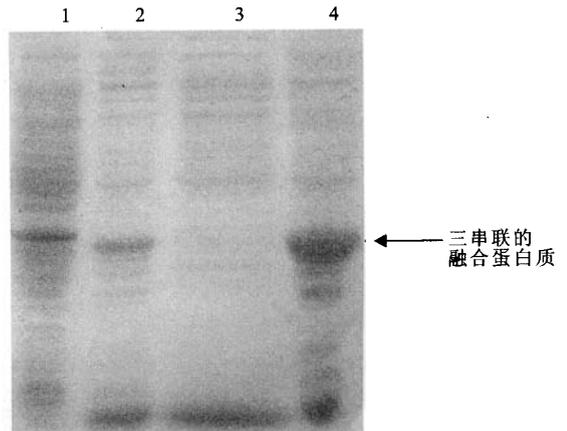
2.5 三串联的测序结果分析

测序结果见图 4. 可以看出,在载体上克隆的目的序列与原序列一致,一致性为 100%.

2.6 融合蛋白质的小量表达

在大肠杆菌 BL21(DE3)中,重组质粒以融合蛋白质的形式表达,表达载体 pGEX-5X-3 本身所表达的 GST 蛋白质相对分子质量为 26 700. 重组以上三段目的基因后,融合蛋白质相对分子质量为 33 400. 12 g/dL SDS-PAGE 电泳分析少量表达样品,结果见图 5. 在相对分子质量约 33 400 处有明显蛋白质条带,而在未诱导条件下未出现,说明加入 IPTG 后融合蛋白质在胞内得到了表达,凝胶扫描分析表明,融合蛋白质表达量可达细菌全蛋白质总量的 30% 左右.

4 °C 孵化 1 h. 用功率 480 W 的超声波破壁,10 000 r/min 离心 10 min,分别取上清液与沉淀,加入蛋白质上样缓冲液. 12 g/dL 的 SDS-PAGE 电泳分析表明,上清液中没有目的蛋白质,目的蛋白质以包含体的形式存在于沉淀中.



1. 不加 IPTG 诱导; 2. 总蛋白质; 3. 上清液; 4. 沉淀

图 6 SDS-PAGE 分析融合蛋白质表达形式

Fig. 6 Expression form of the fused protein analysed by SDS-PAGE

一般情况下,载体 pGEX-5X-3 在 BL21 中表达的蛋白质以溶解状态存在于细胞质中,而本研究中融合蛋白质以包含体的形式出现在沉淀中,作者认为包含体形成的原因:1)表达蛋白质不适当的中间折叠体高浓度的聚集在一起形成不溶物;2)目的蛋白质对大肠杆菌的毒性使融合蛋白质进行了不正常的折叠^[8]。

3 结 语

1) 以鲑鱼抗菌肽为模型,设计合成了仿生鲑鱼抗菌肽的 DNA 序列,通过 PCR 扩增,得到 3 个带

有不同限制性酶切位点的目的序列 XH1、XH2、XH3。

2) 将目的序列分别克隆到表达载体 pGEX-5X-3 上,在载体上得到同向串联的三联体序列重组子。

3) 重组质粒在大肠杆菌 BL21 胞内以融合蛋白质形式表达,融合蛋白质表达量约占总蛋白质质量的 30% 左右。

4) 受体菌株经批量培养,收集细胞,超声波破壁,从裂解液的沉淀中提取到以包含体形式存在的融合蛋白质。

参考文献:

- [1] 文加才,泰永忠,宋爱刚. 阳离子抗菌肽的研究进展[J]. 国外医药抗生素分册,2002,6:267-271.
- [2] In Yup P, Chan Bae P, Mi Sun K, et al. Parasin I-an antimicrobial peptide devided from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*[J]. **FEBS Letters**, 1998, 437: 258-262.
- [3] Ju Hun C, In Yup P, Hun Sik K, et al. Cathepsin D products antimicrobial peptide Parasin I from histone H2A in the skin mucosa of fish[J]. **The FASEB Journal**, 2002, 16: 429-431.
- [4] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, D W 拉塞尔, 等. 分子克隆(第二版)[M]. 金冬雁译. 北京: 科学出版社, 1995.
- [5] 吴冠芸, 潘华珍. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [6] Epand R M, Vogel H J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1999, 1462: 11-28.
- [7] J Carlos Rodriguez, L Wong. The solvent in CNBr cleavage reaction determines the fragmentation efficiency of ketosteroid isomerase fusion protein used in the production of recombinant peptides[J]. **Protein Expression and Purificatin**, 2003, 28: 224-231.
- [8] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2002.

(责任编辑:李春丽)

江南大学工业生物技术教育部重点实验室 2005 年开放课题申请通知

江南大学工业生物技术教育部重点实验室(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University), 今起开始正式受理 2005 年度重点实验室开放课题的申请。2005 年度重点实验室拟资助 10-12 项开放课题。

重点实验室欢迎工业生物技术领域的课题申请,并将优先支持研究内容与《江南大学工业生物技术教育部重点实验室开放课题申请指南》相符合的基础和应用基础研究项目。拟申请重点实验室开放课题资助的项目应当具有明显的创新性和一定的国际竞争能力,能代表我国在工业生物技术领域中的研究水平参与国际竞争。申请人所需具备的资格以及开放课题的管理见《江南大学工业生物技术教育部重点实验室开放课题申请和管理条例》。有兴趣申请课题者请下载《江南大学工业生物技术教育部重点实验室开放课题申请书》,填写完毕后,请一式五份寄至本室。申请截止日期为 2005 年 6 月 15 日。

联系人: 徐静 电话(传真): 0510-5869645 E-mail: klib@sytu.edu.cn

地址: 江苏省无锡市惠河路 170 号 邮政编码: 214036

(注:2005 年开放课题指南见第 75 页)