

# 人 $\beta$ 防御素 3 融合蛋白在大肠杆菌中的 表达、纯化与活性分析

陈 姗 何凤田\* 董燕麟 李蓉芬 高会广 陈 敏 彭家和

(第三军医大学生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

**摘 要** 近年来由于抗生素的不规范使用等多种原因,细菌耐药问题日益严重,人们正努力从各个方面来解决,其中机体天然产生的肽类抗生素(peptide antibiotics)由于其对耐药菌的强大抗菌作用而受到人们的关注。肽类抗生素是一种阳离子小分子多肽,在天然免疫和获得性免疫中都发挥着重要作用。防御素(defensin)是肽类抗生素中较为重要的一种,主要来源于皮肤、呼吸道等的上皮组织,是正常机体抵抗外界病原微生物入侵的重要防线。人  $\beta$ -防御素 3(human beta-defensin 3, h $\beta$ D-3)参与人体免疫屏障,并因具有广谱抗菌和抗菌活性不被盐离子浓度抑制等特点而具特别的研究开发价值。提取中国人扁桃体组织总 RNA,以 RT-PCR 技术扩增编码 h $\beta$ D-3 成熟肽的 cDNA 并构建于原核表达载体 pQE-80L, IPTG 诱导表达后利用 SDS-PAGE、免疫印迹等方法对重组蛋白进行分析。重组蛋白表达量达到细菌表达总量的 40%。重组蛋白自表达菌包涵体中提取后,经亲和和层析法纯化目的蛋白达到电泳纯,经多步透析法复性,在体外抗菌实验中表现出了对金黄色葡萄球菌、多重耐药金黄色葡萄球菌等的抗菌活性,为进一步的研究和开发奠定了基础。

**关键词** h $\beta$ D-3, 肽类抗生素, 克隆, 融合表达

**中图分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)04-0490-06

肽类抗生素(peptide antibiotics)是一种广泛存在于植物和动物体内的阳离子小分子多肽,参与生物天然免疫和获得性免疫,目前人们已广泛开展对于其免疫调节活性和抗菌功能的研究和利用<sup>[1-6]</sup>。

防御素(defensin)是肽类抗生素中较为重要的一种<sup>[7-8]</sup>,主要来源于皮肤、呼吸道等上皮组织,遇到病原微生物刺激时表达增强,是正常机体抵抗外界病原微生物入侵的重要防线。防御素因为具有强大的尤其是针对耐药菌的抗菌功能而吸引了人们的关注,其中最为引人注目的是  $\beta$ -防御素<sup>[9-13]</sup>。人  $\beta$ -防御素 3(human beta-defensin 3, h $\beta$ D-3)是新近被克隆出来的第三种人源性  $\beta$ -防御素,它在抗菌谱、盐离子敏感性等方面表现出了与其它几种人  $\beta$ -防御素不同的特性和优越性,被认为具有独特的研究和开发价值<sup>[14]</sup>。本试验以人扁桃体中提取的总 RNA 为模板,利用 RT-PCR 技术,扩增了编码 h $\beta$ D-3 成熟肽的 cDNA 序列,并连同运载蛋白 DHFR 构建于新型原核

表达载体 pQE-80L,经 IPTG 诱导后表达了重组 h $\beta$ D-3 融合蛋白,提取并纯化后的融合蛋白经体外抗菌试验验证具有抗菌活性,为进一步研究和开发 h $\beta$ D-3 打下了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 扁桃腺组织**:由第三军医大学附属大坪医院提供。

**1.1.2 质粒和菌种**:克隆质粒 pUC18 购自华美公司,表达质粒 pQE80-L 和 pQE40 购自 Qiagen 公司。大肠杆菌 JM109 和 DH5 $\alpha$  由本室保存。大肠杆菌 M15 由北京军科院五所王希良副教授惠赠。金黄色葡萄球菌、白色念珠菌由本校微生物教研室惠赠。

**1.1.3 引物**:PCR 引物由上海 Sagon 公司合成。

**1.1.4 主要试剂**:Tripure Isolation Reagent 和 High Pure PCR Product Purification Kit(Roche 公司),Access

收稿日期 2003-12-19,修回日期 2004-03-25。

基金项目 重庆市科学基金委员会项目资助(No. 7535)。

\* 通讯作者。Tel 86-23-68752262;E-mail:cs723cn@yahoo.com.cn

RT-PCR System( Promega 公司),T4DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Kpn* I 和 *Hind*III 和 DNA Marker DL-2000( 大连 TaKaRa 公司),小鼠抗人 His 抗体( 德国 Qiagen 公司),HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG( 华美公司),蛋白纯化用缓冲液( Buffer A :100mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,10mmol/L Tris,8mol/L Urea, pH8.0 ;Buffer B 取 200mL Buffer A,用 HCl 调 pH 值至 6.3 ;Buffer C 取 200mL Buffer A,加入 2.72g 咪唑,调 pH 值至 5.9 ;Buffer D :取 200mL Buffer A,用 HCl 调 pH 值至 4.5),复性液( 0.8mol/L 尿素,0.1mmol/L 氧化型谷胱甘肽,0.9 mmol/L 还原型谷胱甘肽,10mmol/L Tris, pH8.0)等。

**1.1.5 主要仪器:**PCR 仪( 美 MJ Research. Inc., PTC-100 型),台式低温高速离心机( 德国 Heareus, Biofuge 15R 型),琼脂糖凝胶电泳装置和电转印仪( 北京六一仪器厂),Bio-Rad 垂直蛋白电泳槽及凝胶扫描仪,Sigma 高速低温离心机,冷冻干燥仪( 丹麦 Heto. Inc, CT60E 型),Bechman DU-640 型分光光度计等。

## 1.2 方法

**1.2.1 h $\beta$ D-3 的 cDNA 克隆:**收集手术切除的人扁桃体组织,采用 Tripure 一步法提取细胞总 RNA。根据 GenBank 中编码 h $\beta$ D-3 成熟肽 45 个氨基酸的 cDNA 序列,设计特异引物:上游引物 5'-CCGGTAC-CGGAATCATAAACACATTA-CAG-3'(下划线处为 *Kpn* I 酶切位点);下游引物 5'-CCAAGCT-TTTATTTCTTCTTCGGCAGCA-3'(下划线处为 *Hind* III 酶切位点)。RT-PCR 按试剂盒说明进行。48 $^{\circ}\text{C}$  45min,94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 2min,然后 94 $^{\circ}\text{C}$  30s,60 $^{\circ}\text{C}$  1min,68 $^{\circ}\text{C}$  2min 40 个循环,最后 68 $^{\circ}\text{C}$  延伸 7min。RT-PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶扫描仪下观察并记录结果。PCR 产物连接于克隆载体 pUC18,经蓝白斑筛选和双酶切鉴定获得重组质粒 pUC18/h $\beta$ D-3,送往测序。DNA 序列测定由上海生工公司完成。

**1.2.2 原核表达载体的构建:**将目的片段自 pUC18/h $\beta$ D-3 酶切回收,连同自 pQE40 质粒上切下的运载蛋白 DHFR 表达基因片段一起连接于原核高效表达载体 pQE-80L。经酶切鉴定,得到重组原核表达载体 pQE-80L/DHFR/h $\beta$ D-3。同时将表达 DHFR 的基因片段直接与 pQE-80L 质粒连接,经酶切筛选得到重组对照质粒 pQE-80L/DHFR。

**1.2.3 融合蛋白的诱导表达:**分别将重组原核表达质粒 pQE-80L/DHFR/h $\beta$ D-3 和重组对照质粒 pQE-80L/DHFR 转入表达宿主菌大肠杆菌 M15。根据不

同的 IPTG 浓度、诱导时间和诱导温度进行诱导表达,以筛选和优化诱导表达条件。参照《分子克隆手册》灌制 SDS-PAGE 胶。5% 的积层胶,15% 的分离胶,变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测蛋白的表达。参照《分子克隆手册》及 Qiagen 试剂手册进行蛋白质免疫印迹(Western blotting)确定蛋白的表达<sup>[15]</sup>。

**1.2.4 表达蛋白的分离、纯化:**依照优化确定的条件大量诱导表达目的蛋白。收集细菌,超声碎菌,鉴定融合蛋白是以分泌形式表达还是形成包涵体。然后按 Qiagen 公司说明书洗涤及溶解包涵体。将 50% Ni-NTA slurry 和包涵体溶解物上清按一定比例混匀,上柱,依次用不同的蛋白纯化用缓冲液洗柱,收集相应液体。将其中的目的蛋白洗脱液稀释后装入透析袋,4 $^{\circ}\text{C}$  多步透析复性(复性液 12h,复性液 10h,TE 缓冲液 10h)。复性后的液体冷冻抽干并置 -70 $^{\circ}\text{C}$  保存。

**1.2.5 复性后的融合蛋白活性鉴定:**少量蛋白粉末溶解后,以牛血清白蛋白标准品为参照,紫外分光光度计测蛋白浓度。以 DHFR 融合蛋白为对照,用琼脂扩散法检测重组 h $\beta$ D-3 融合蛋白对金黄色葡萄球菌、多重耐药金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及白色念珠菌的抗菌活性。

## 2 结果

### 2.1 编码 h $\beta$ D-3 成熟肽的 cDNA 克隆

RT-PCR 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳后,可在约 140bp 位置见到清晰的目的条带(图 1)。

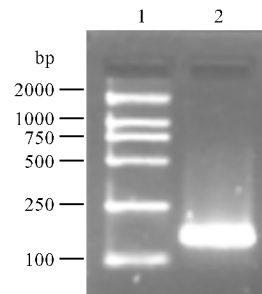


图 1 RT-PCR 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 The result of RT-PCR

1 :DNA Marker DL-2000 ;

2 :amplified DNA fragment encoding h $\beta$ D-3

与克隆质粒 pUC18 相连后经蓝白斑筛选和双酶切鉴定得到阳性重组子 pUC18/h $\beta$ D-3,送往测序。经 DNA 序列测定,所获得 cDNA 序列长度为 135bp,与

GenBank 上登录的相应 cDNA 序列完全一致。本序列作为自中国人克隆的 h $\beta$ D-3 被 GenBank 登录, 登录号为 AF516673。

### 2.2 蛋白原核表达载体的构建

pQE-80L/DHFR/h $\beta$ D-3 重组子经 *Kpn* I + *Hind* III 双酶切后, 可见大小约为 135bp 的片段。经 *Bam*HI + *Kpn* I 和 *Bam*HI + *Hind* III 双酶切后, 可分别见到大小约为 550bp 和大小约为 700bp 的片段。pQE-80L/DHFR 重组子经 *Bam*HI + *Kpn* I 双酶切后, 可见大小约为 550bp 的片段。参见图 2。

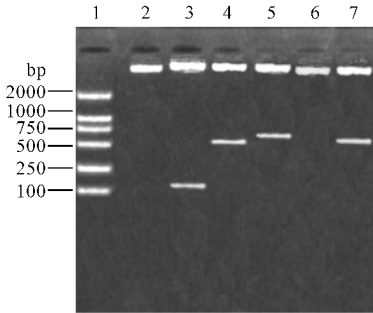


图 2 重组原核表达载体 pQE-80L/DHFR/h  $\beta$ D-3 和对照质粒 pQE-80L/DHFR 的构建

Fig.2 The restriction endonuclease map of pQE-80L/DHFR/h  $\beta$  D-3 and pQE-80L/DHFR

- 1 :DNA Marker DL-2000 ;
- 2 pQE-80L/DHFR/h  $\beta$ D-3 ;
- 3 pQE-80L/DHFR/h  $\beta$ D-3/*Kpn* I + *Hind* III ;
- 4 pQE-80L/DHFR/h  $\beta$ D-3/*Bam*HI + *Kpn* I ;
- 5 pQE-80L/DHFR/h  $\beta$ D-3/*Bam* I + *Hind* III ;
- 6 pQE-80L/DHFR ;
- 7 pQE-80L/DHFR/*Bam*HI + *Kpn* I

### 2.3 融合蛋白的诱导表达

经优化实验, 确定最佳诱导表达条件为终浓度 1mmol/L 的 IPTG 在 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 4h。SDS-PAGE 分析, 可清楚地看见重组原核表达载体 pQE-80L/DHFR/h $\beta$ D-3 表达的蛋白带和对照质粒 pQE-80L/DHFR 表达的蛋白带, 大小分别约为 31kD 和 26kD。其中目的蛋白的表达量经软件分析, 达到了细菌表达蛋白总量的约 40%。Western blotting 检测可见, 在大小分别约为 31kD 和 26kD 的位置可见两条清楚的蛋白带。参见图 3 A。

### 2.4 表达蛋白的分离、纯化

经 SDS-PAGE 检测, 表达蛋白主要是以包涵体的形式存在。包涵体溶解物过 Ni-NTA 柱纯化, 经不同缓冲液洗脱并收集目的蛋白, 然后经多步透析法复性后冰冻抽干, 自 100mL 菌液得到约 8mg 的表达蛋白( DHFR/h $\beta$ D-3 融合蛋白与 DHFR 融合蛋白分别

用相同方法提取)。以 SDS-PAGE 检测, 纯化蛋白为单一条带( 见图 5 )。

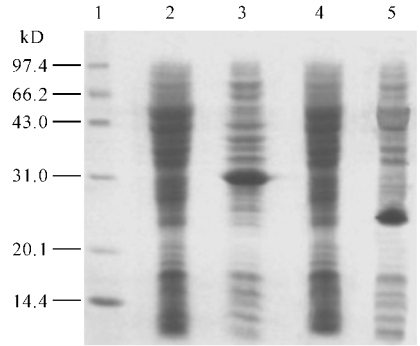


图 3 重组原核表达载体 pQE-80L/DHFR/h $\beta$ D-3 和对照质粒 pQE-80L/DHFR 在 IPTG 诱导下的不同表达

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expression of pQE-80L/DHFR/h  $\beta$ D-3 and pQE-80L/DHFR

- 1 SDS-PAGE protein marker ;
- 2 pQE-80L/DHFR/h $\beta$ D-3 ;
- 3 pQE-80L/DHFR/h $\beta$ D-3 induced by 1mmol/L IPTG 37 $^{\circ}$ C 4h ;
- 4 pQE-80L/DHFR ;
- 5 pQE-80L/DHFR induced by 1mmol/L IPTG 37 $^{\circ}$ C 4h

### 2.5 复性后蛋白活性鉴定( 体外抗菌实验 )

体外抗菌实验显示了 h $\beta$ D-3 融合蛋白对金黄色葡萄球和多重耐药金黄色葡萄球菌的抗菌活性, 而用于对照的 DHFR 融合蛋白未表现出任何的抗菌活性( 参见图 6 )。h $\beta$ D-3 对多重耐药金黄色葡萄球菌的抗菌活性尤其显示了防御素抗耐药菌的生物学优越性。此外, 在较大剂量时, 目的融合蛋白还表现出了对白色念珠菌的抗菌活性。但是在我们的试验中, 提取的目的融合蛋白没有表现出对大肠杆菌的抗菌活性。

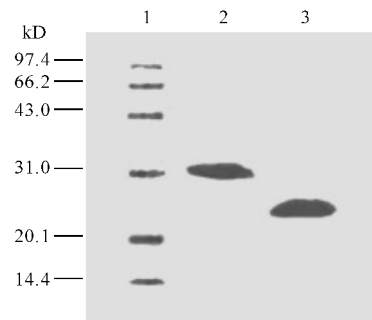


图 4 蛋白免疫印迹

Fig.4 Western blotting analysis of expression of pQE-80L/DHFR/h  $\beta$  D-3 and pQE-80L/DHFR

- 1 :SDS-PAGE protein marker ;
- 2 pQE-80L/DHFR/h  $\beta$  D-3induced by 1mmol/L IPTG 37 $^{\circ}$ C 4h

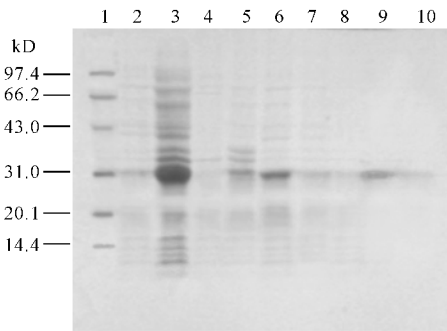


图 5 重组原核表达载体 pQE-80L/DHFR/h $\beta$ D-3 经 1mmol/L IPTG 37℃ 诱导 4 h 后表达蛋白的分离、纯化  
Fig.5 Purification of recombinant h $\beta$ D-3 fusion proteins expressed in *E. coli* induced by 1mmol/L IPTG for 4 hours

- 1 SDS-PAGE protein Marker ;
- 2 supernatant after lysis of bacterial ;
- 3 deposition after lysis of bacterial ;
- 4 washing of deposition ;
- 5 deposition after lysis of inclusion body ;
- 6 supernatant after lysis of inclusion body ;
- 7~10 collection after eluted by Buffer  
A , B , C and D in turn

### 3 讨论

几个世纪以来,人们一直与病原微生物进行着艰苦卓绝的斗争,抗生素的发现和广泛应用无疑为人类增添了抗感染的利刃。然而,近年来由于抗生素的不合理使用等多种原因,细菌耐药现象日益严重,大量耐药菌的出现使人们的生命健康又一次面临巨大挑战。在调整用药策略的同时,人们正积极寻找新的方法来对抗和解决这一问题。目前主要集中在两方面:一是从病菌基因组序列寻找新的药物作用靶位,取最不容易突变的靶位,设计抗菌药。二就是研究和开发肽类抗生素<sup>[1-3,16]</sup>。肽类抗生素(peptide antibiotics)又名抗菌肽(antimicrobial peptide),广泛存在于动植物体内,是由生物体特定基因编码的一类阳离子小分子多肽,具有广谱抗菌活性,是机体天然免疫的重要组成部分<sup>[4-6,17]</sup>。最初人们是因为其对细菌的杀灭活性而发现它的,因此命名为抗菌肽,后来人们发现它不仅对细菌有作用,而且对真菌等其它病原微生物也有杀灭作用,于是改名为肽类抗生素,但是很多时候仍沿用抗菌肽的称呼。防御素是肽类抗生素中较为重要的一种<sup>[7-8]</sup>。

防御素是 1980 年洛杉矶 Lherer 实验室首先从兔肺巨噬细胞中发现的,现已发现 20 余种,包括  $\alpha$ -防御素和  $\beta$ -防御素两种<sup>[3,14,16,18]</sup>。目前人们已发现了 4 种人体的  $\beta$ -防御素(human beta-defensin, h $\beta$ D)。

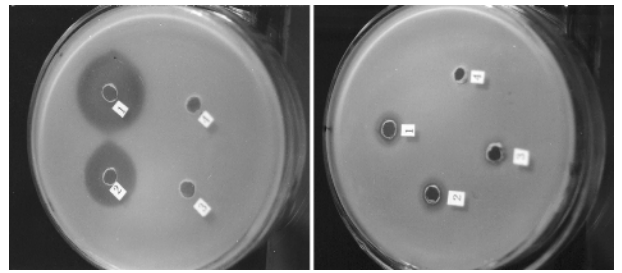


图 6 重组 h $\beta$ D-3 融合蛋白对金黄色葡萄球菌(左)多重耐药金黄色葡萄球菌(右)的体外抗菌试验

Fig.6 Recombinant h $\beta$ D-3 fusion proteins show the antimicrobial activity to staphylococcus aureus( left ) and multiresistant staphylococcus aureus( only vancomycin-sensitive )( right )

h $\beta$ D-1 由 Bensch KW 等于 1995 年从肾衰患者透析液中获得, h $\beta$ D-2 是 Harder J 等于 1997 年从银屑病患者上皮中分离得到<sup>[19-24]</sup>,这两种人  $\beta$  防御素都具有很强的抗菌能力,但主要是针对革兰氏阴性菌。H $\beta$ D-4 仅在感染期间组织特异性诱导和有限表达于睾丸,子宫,甲状腺,肺和肾脏<sup>[25]</sup>。人  $\beta$ -防御素 3 (human beta-defensin, h $\beta$ D-3) 是 2001 年首次分离获得,全长 67 个氨基酸,经剪切后形成 45 个氨基酸的活性肽。相比较前两种人  $\beta$  防御素而言, h $\beta$ D-3 在很小剂量范围内就表现出对革兰氏阳性菌的抗菌活性,同时其抗菌活性是非盐离子浓度敏感性的,也不引起溶血,具有独特的研究和开发价值。h $\beta$ D-3 在人体正常组织中的含量很少难以提取,体外化学合成成本很高,因此本研究通过基因工程技术来获得活性重组 h $\beta$ D-3 融合蛋白,为下一步的研究和开发打下基础。

真核表达系统虽然可以实现有效的转录、表达以及翻译后的后期加工过程,但表达水平一般较低。同时有文献报道,通过原核表达系统获得的重组 h $\beta$ D-3 在抗菌活性、生化特征上与提取的天然 h $\beta$ D-3 毫无差异<sup>[14,26]</sup>。因此我们仍选用原核表达系统来表达 h $\beta$ D-3。在本试验中,我们选用了特别适合表达毒性蛋白的新型高效表达载体 pQE-80L。pQE-80L 载体带有 lac 抑制子,在未加入诱导剂 IPTG 以前,转录不启动,具有“毒性”的目的蛋白不表达,故并不影响宿主菌的生长。在宿主菌生长到一定数目以后,再加入 IPTG 诱导生长,就可获得大量表达的目的蛋白。此外,使用 pQE-80L 载体表达的目的蛋白 N 端带有 His-tag,使表达的蛋白在后期分离中易于通过镍柱分离纯化。

利用原核系统表达肽类抗生素的另一个难点在于肽类抗生素分子量都很小,比如我们所要表达的 h $\beta$ D-3

成熟肽只有 5kD,即使是在 N 端加上一个 His-tag,仍然不能获得有效表达。于是我们以 DHFR 作为运载蛋白,而获得了 h $\beta$ D-3 融合蛋白稳定的表达,同时以 DHFR 为对照研究了表达蛋白的生物学活性。我们选择将 His-tag 和 DHFR 都连接于 h $\beta$ D-3 的 N 端,是因为有文章报道主要是 h $\beta$ D-3 的 C 端参与和完成了在细菌壁上打孔从而杀灭细菌的作用,在 N 端添加融合蛋白将尽可能地减小对 h $\beta$ D-3 活性的影响。我们最终获得的重组 h $\beta$ D-3 融合蛋白具有抗菌活性也是对这一理论的支持。

人们还不清楚肽抗生素能够杀灭细菌的机制,目前认为主要是肽抗生素的 C 端参与其中。从我们的试验结果来看,在 N 端带上了 His-tag 和运载蛋白 DHFR 的重组 h $\beta$ D-3 融合蛋白仍然具有抗菌活性,从另一个角度支持了 h $\beta$ D-3 的主要功能区在 C 端的看法。但是 N 端所附属的其它蛋白可能在某种程度上仍影响了重组 h $\beta$ D-3 蛋白的生物学活性。我们的体外抗菌实验中,重组 h $\beta$ D-3 融合蛋白没有对大肠杆菌表现出抗菌活性,对白色念珠菌在很高浓度时才表现抗菌活性,这是否是因为在 N 端带上了 His-tag 和运载蛋白 DHFR 所至呢?目前还不能确定。从另外一个角度说,如果确实是因为在 N 端添加了 His-tag 和 DHFR 所至,或者是在以后的试验中找到的其它什么原因所至,也许可以作为肽抗生素在通往临床运用的道路上克服或消减抗菌谱过广这一弱点的思路。

## REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Francois J Picard , Michel G. Bergeron molecular theranostics in infectious diseases is an emerging concept in which molecular biology tools are used to provide rapid and accurate diagnostic assays. *Drug Discovery Today* , 2002 , 7 :1092 - 1101

[ 2 ] Steven J Projan. Although the need for new antibacterial therapies and strategies is greater than it has been in a quarter of a century , little progress has been observed in the development of new antibacterial agents. *Current Opinion in Pharmacology* , 2002 , 2 : 513 - 522

[ 3 ] Robert E W , Hancock Daniel S. Chapple. Peptide antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* , 1999 **43** :1317 - 1323

[ 4 ] Allington D R , Rivey M P. Quinupristin/ dalfopristin : a therapeutic review. *Clin-Ther* , 2001 , **23** : 24 - 44

[ 5 ] Boman-HG. Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity : an update review. *Scand-J-Immunol* , 1998 , **48** : 15 - 25

[ 6 ] Charles A. Janeway Jr. How the immune system protects the host from infection. *Microbes and Infection* , 2001 , **3** : 1167 - 1171

[ 7 ] Robert Bals. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* , 2000 , **1** : 141 - 150

[ 8 ] Schroder JM. Epithelial antimicrobial peptides : innate local host response elements. *Cell-Mol-Life-Sci* , 1999 , **56** : 32 - 46

[ 9 ] Pardi A , Zhang XL , Selsted ME *et al* . NMR studies of defensin antimicrobial peptides : Three-dimensional structures of rabbit NP-2 and human neutrophil-1. *Biochemistry* , 1992 , **31** : 11357 - 11364

[ 10 ] Weinberg A , Krisanaprokkit S , Dale B A. Epithelial antimicrobial peptides : Review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med* , 1996 , **9** : 399 - 414

[ 11 ] Ganz T. Defensins and host defense. *Science* , 1999 , **286** : 420 - 421

[ 12 ] Selsted ME , Szklarek D and Lehrer RI. Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. *Infect Immun* , 1984 , **46** : 150 - 154

[ 13 ] Bonmatin JM , Bonnat JL , Gallet X *et al* . Two-dimensional <sup>1</sup>H NMR study of recombinant insect defensin A in water : resonance assignments , secondary structure and global folding. *J Biomol* , 1992 , **2** : 235 - 256

[ 14 ] Jürgen Harder , Joachim Bartels , Enno Christophers *et al* . Isolation and Characterization of Human  $\beta$ -Defensin-3 , a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic. *The Journal of Biological Chemistry* , 2001 , **276**( 8 ) : 5707 - 5713

[ 15 ] Joseph Sambrook , David W Russell. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* , 3<sup>rd</sup> ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 2001

[ 16 ] Rizzo A. Leukocyte antimicrobial peptides : multifunctional effector molecules of innate immunity. *J Leukoc Biol* , 2000 , **68** : 785 - 792

[ 17 ] Rao A G. Antimicrobial peptides. *MPIIM* , 1995 , **8** : 6 - 13

[ 18 ] Tang YQ , Yuan J , Osapay G *et al* . A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated K-defensins. *Science* , 1999 , **286** : 498 - 502

[ 19 ] Stolzenberg ED , Anderson GM , Ackermann MR *et al* . Epithelial antibiotic induced in states of disease. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1997 , **94** : 8686 - 8690

[ 20 ] Diamond G , Russell JP , Bevins CL. Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1996 , **93** : 5156 - 5160

[ 21 ] Harder J , Bartels J , Christophers E *et al* . A peptide antibiotic from human skin. *Nature* , 1997 , **387** : 861

[ 22 ] Bensch KW , Raida M , Magert HJ *et al* . HBD-1 : a novel L-defensin from human plasma. *FEBS Lett* , 1995 , **368** : 331 - 335

[ 23 ] Valore EV , Park CH , Quayle AJ *et al* . Human L-defensin-1 : an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* , 1998 , **101** : 1633 - 1642

[ 24 ] Selsted ME , Tang YQ , Morris WL *et al* . Purification , primary structures , and antibacterial activities of L-defensins , a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J Biol Chem* , 1993 , **268** : 6641 - 6648

[ 25 ] Garcia JR , Krause A , Schulz S *et al* . Human L-defensin 4 : a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* , 2001 , **15** : 1819 - 1821

[ 26 ] Raj PA , Antonyraj KJ , Karunakaran T. Large-scale synthesis and functional elements for the antimicrobial activity of defensins. *Bio-*

## The Cloning High Level Expression in *Escherichia coli* of Human Beta-Defensin 3 and Its Antimicrobial Activity Analysis

CHEN Shan HE Feng-Tian\* DONG Yan-Lin LI Rong-Fen

GAO Hui-Guang CHEN Min PENG Jia-He

( Department of Biochemistry and Molecular Biology , the Third Military Medical University , Chongqing 400038 , China )

**Abstract** In recent years , Bacterial resistance is more and more serious for the irrational use of antibiotics produces resistant strains and other reasons ,. Human are trying to solve the problem from different ways , including the study of antimicrobial peptides. Defensin is one of the most important of antimicrobial peptides. A novel antimicrobial peptide , human  $\beta$ -defensin 3 , was isolated and demonstrated a salt-insensitive broad spectrum of potent antimicrobial activity against many potentially pathogenic microbes. The total RNA was extracted from human tonsil and the h $\beta$ D-3 specific cDNA sequence was amplified with RT-PCR . After sequenced , the target DNA fragment was cloned into pQE-80L vector together with the DNA fragment *encoding carrier* protein DHFR. The recombinant vectors were transformed into *E. coli* M15 and the expression was induced based on the optimal values of the IPTG concentration incubation temperature and induction time determined in the previous section. The expressed proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western-blotting. The mass of the recombinant protein was about 40% of total bacteria protein. Isolate and purify the target protein. The recombinant h $\beta$ D-3 fusion proteins possess the antimicrobial activity to staphylococcus aureus , multiresistant staphylococcus aureus ( only vancomycin-sensitive ) and *Candida albicans* in the assay of drug susceptibility. Advanced study can be continued based on our experiments.

**Key words** h $\beta$ D-3 , antimicrobial peptide , cDNA cloning , fusion protein expression

Received :12-19-2003

This work was supported by Grant from Chongqing Science Technology Committee( No. 7535 ).

\* Corresponding author. Tel : 86-23-68752262 , E-mail : cs723cn@yahoo.com.cn