

人 α 防御素 5 在大肠杆菌中的可溶性表达与纯化研究

王艾平, 粟永萍, 程天民, 邹仲敏, 王军平

第三军医大学军事预防医学院全军复合伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400038

摘要: 采用 PCR 扩增大肠杆菌偏好的人 α 防御素 5 成熟肽(mHD-5)密码子序列, 并将其克隆至 pMAL-p2x 质粒, 构建 pMAL-p2x-mHD-5 表达载体, 转化大肠杆菌 BL₂₁(DE₃), 诱导表达, SDS-PAGE 分析目的蛋白表达量并优化表达条件。经亲和层析、酶切和离子交换层析等方法分离、纯化重组 mHD-5(rmHD-5)多肽。采用浊度法测定 rmHD-5 对细菌的抑制活性。通过优化表达条件, 获得约 30%的可溶性目的蛋白表达量, 并成功纯化 rmHD-5。rmHD-5 对大肠杆菌标准菌株(ATCC25922)具有较强的抑制活性, 在终浓度为 62.5 μ g/mL 时, 90%以上的细胞被抑制。结果表明采用可溶性融合表达策略, 在原核表达系统中诱导表达并纯化具有生物活性的防御素是可行的途径之一。

关键词: 防御素, 原核表达, 纯化, 生物活性

Soluble Expression and Purification of Human Alpha-Defensin-5 in *Escherichia coli*

Aiping Wang, Yongping Su, Tianmin Cheng, Zhongmin Zou, and Junping Wang

Institute of Combined Injury of the People's Liberation of Army; National Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Abstract: DNA fragment containing human alpha-defensin 5 mature peptide (mHD-5) coding sequence with biased codons of *E. coli* was amplified by PCR, which was subsequently cloned into the plasmid pMAL-p2x in order to create pMAL-p2x-mHD-5 expression vector. The plasmid pMAL-p2x-mHD-5 was transferred into engineered strain BL₂₁(DE₃) to express heterogeneous fusion protein (MBP-mHD-5). The soluble MBP-mHD-5 targeted protein inducible expressed by IPTG was accounted for about 30% under optimized conditions. The recombinant mHD-5 (rmHD-5) peptide was successfully purified through a separation process including affinity chromatography, Factor Xa digestion and ion exchange chromatography. The bioactivity of rmHD-5 was examined by bacteria-inhibition tests in liquid culture. The growth of *E. coli* ATCC25922 was dramatically suppressed with an inhibition rate of 90%, with the presence of 62.5 μ g/mL rmHD-5 in the media. These results indicate that the strategy of soluble expression of fusion protein in *E. coli* can be a useful and practical way to produce bioactive defensins.

Keywords: defensin, prokaryotic expression, purify, bioactivity

细菌、真菌、昆虫、植物、鸟类、哺乳动物包括人等各种生物均产生具有抗菌和免疫调节等生物

活性的小肽, 统称为抗菌肽或肽抗生素。现已发现近千种抗菌肽, 其中动物和高等植物细胞产生的抗

Received: April 26, 2007; **Accepted:** July 3, 2007

Supported by: Sci & Tech Research Foundation of PLA "Eleventh Five-Year Plan" (No. 06G076), the National Natural Science Foundation of China (No. 30771892), and Academician Fund of Chongqing City (No. CSTC, 2007AB5022).

Corresponding author: Junping Wang. Tel: +86-23- 68752883; E-mail: wangjunp@yahoo.com

军队“十一五”科技攻关项目(No. 06G076)、国家自然科学基金(No. 30771892)和重庆市院士基金(No. CSTC, 2007AB5022)资助。

菌肽又称为防御素^[1]。迄今为止,相继发现了6种人防御素(HNP1-4, HD-5, HD-6)和6种人防御素(HBD1-6)。人 α 防御素5成熟肽(mHD-5)是由32个氨基酸残基组成,分子量为3.58 kD的阳离子多肽,含保守的6个半胱氨酸残基,构成3个分子内二硫键,形成稳定的肽链折叠,并进而形成具有3条 β -折叠片组成的两歧性分子。研究发现,HD-5除在小肠潘氏细胞中大量分泌表达外;在生殖道上皮细胞、鼻粘膜和部分正常支气管粘膜等细胞中也存在固有表达,还可因炎症、感染和细胞恶性转化等因素的刺激而表达、分泌上调^[2,3]。由此可见,mHD-5在消化道、生殖道等粘膜内源性感染预防和免疫保护调节中发挥着重要作用。研究表明,化学合成、从粘膜组织提取或哺乳动物细胞表达的mHD-5不仅具有高效的广谱抑/杀病原细菌和参与免疫保护调节作用活性^[4],而且具有阻止HIV、HSV等病毒粘附进入细胞和抑制病毒颗粒复制的抗病毒作用^[5-7]。

在细菌耐药已经成为全球性医学难题的今天,mHD-5展现了作为新型抗病原微生物药物的前景。鉴于mHD-5因富含精氨酸和半胱氨酸导致化学合成困难,复性效率低,成本高的现状,本研究率先构建mHD-5与MBP融合表达载体,屏蔽了防御素对宿主菌的毒性,实现了可溶性高表达,并探索了多肽的纯化工艺,为mHD-5的开发奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株与主要试剂

pMAL-p2x质粒、*Xmn* I、*Fsp* I、*Hind* III内切酶、Amyloses树脂和Factor Xa购自NEB公司;CM Sepharose FF购自GE公司;寡聚DNA单链订购于上海生物工程公司;Pyrobest DNA Polymerase、T4 DNA Ligase购自TaKaRa公司;DH5 α 、BL₂₁(DE₃)、ATCC 25922和ATCC 25923菌株由本所保存。

1.2 寡聚DNA单链的设计

根据大肠杆菌密码子使用偏好优化人源HD-5成熟肽基因序列,设计一对寡脱氧核苷酸序列。P1的5'端引入*Fsp* I酶切位点,P2的5'端引入*Hind* III酶切位点。序列分别为:P1: 5'-CGGATCTGCGCAACCTGCTATTGCCGTACCGCCGTTGCGCGACC

CGTGAAAGCCTGAGCGGCGTGT-3'; P2: 5'-CCCAAGCTTTCATTAGCGACAGCACAGACGATACAGACGGCCGCTAATTTTCGCACACGCCGCTCAGGC-3'。

1.3 mHD-5 密码子优化序列的克隆

利用P1和P2即用作引物又作为模板进行PCR扩增,产物长度为120 bp(含引物两端的酶切位点和保护碱基)。反应条件:94 30 s 50 30 s 72 15 s,共25个循环,然后72 延伸2 min后终止反应。

1.4 pMAL-p2x-mHD-5 表达质粒的构建(图1)

将PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳后,切下目的条带并纯化回收,用*Fsp*和*Hind* III双酶切(37, 8 h)后再凝胶电泳回收目的片段。将pMAL-p2x质粒用*Xmn* I和*Hind* III双酶切(37, 4 h)后凝胶回收大片段。回收mHD-5目的片段和线性化pMAL-p2x载体,按4:1比例,在T4 DNA连接酶作用下反应(16, 16 h),然后电转化至*E. coli* DH5 α 菌株,Amp抗性筛选阳性重组子,阳性菌落扩增后提取质粒,*Bgl* II和*Hind* III双酶切初步鉴定,并委托上海生物工程公司测序。序列正确的重组子质粒再转化至表达宿主菌BL₂₁(DE₃)。

1.5 重组蛋白的诱导与表达形式鉴定

取重组工程菌过夜培养液40 μ L转种于2 mL TB培养基(Amp终浓度为100 μ g/mL),37 培养至OD₆₀₀ \approx 0.6时,加入终浓度1 mmol/L IPTG诱导5 h,超声破胞后取离心上清和沉淀,SDS-PAGE鉴定表达形式,使用蛋白定量试剂盒测定并计算表达量。

1.6 目的蛋白可溶性表达条件优化与纯化

分别在37、30、25、15 和或1、0.5 mmol/L IPTG条件下采用1.5方法诱导表达,取上清电泳确定可溶性高表达条件。在优化条件下,采用溶菌酶法裂解诱导表达重组菌,收集含目的蛋白的PB(20 mmol/L, pH 7.2)缓冲液上清。对蛋白溶液行Q Sepharose FF层析后再进行Amyloses亲和层析,收集洗脱峰,电泳鉴定。

1.7 融合蛋白裂解与目的肽纯化

参考说明书,用Factor Xa裂解融合蛋白。裂解蛋白液过SP阳离子层析柱,收集分离峰并电泳鉴定。用截留分子量为1.5 kD的透析带在ddH₂O中将目的肽溶液透析过夜,冻干。

1.8 重组mHD-5 (rmHD-5)抑菌活性测定

选用文献[4]中的方法略做改进,即将在MHB培养液中过夜生长细菌用缓冲液(10 mmol/L PB,

pH7.2) 稀释至 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cfu/mL, 与溶于含 0.01% 醋酸 PB 缓冲液中的不同浓度 rmHD-5 等体积混匀后于 37 培养 3 h, 取 10 μ L 涂于 MHB 平板继续培养 14 h 后计算菌落数以判断抑菌活性。采用酶标仪测定倍比稀释的 rmHD-5 在 96 孔细胞培养板中

的细菌浊度, 计算 rmHD-5 对 ATCC 25922 和 ATCC 25923 2 种标准菌株的抑菌效果。

1.9 统计学处理

采用统计软件 SPSS 10.0 进行 *t* 检验和分析。实验独立重复 3 次以减少实验误差。

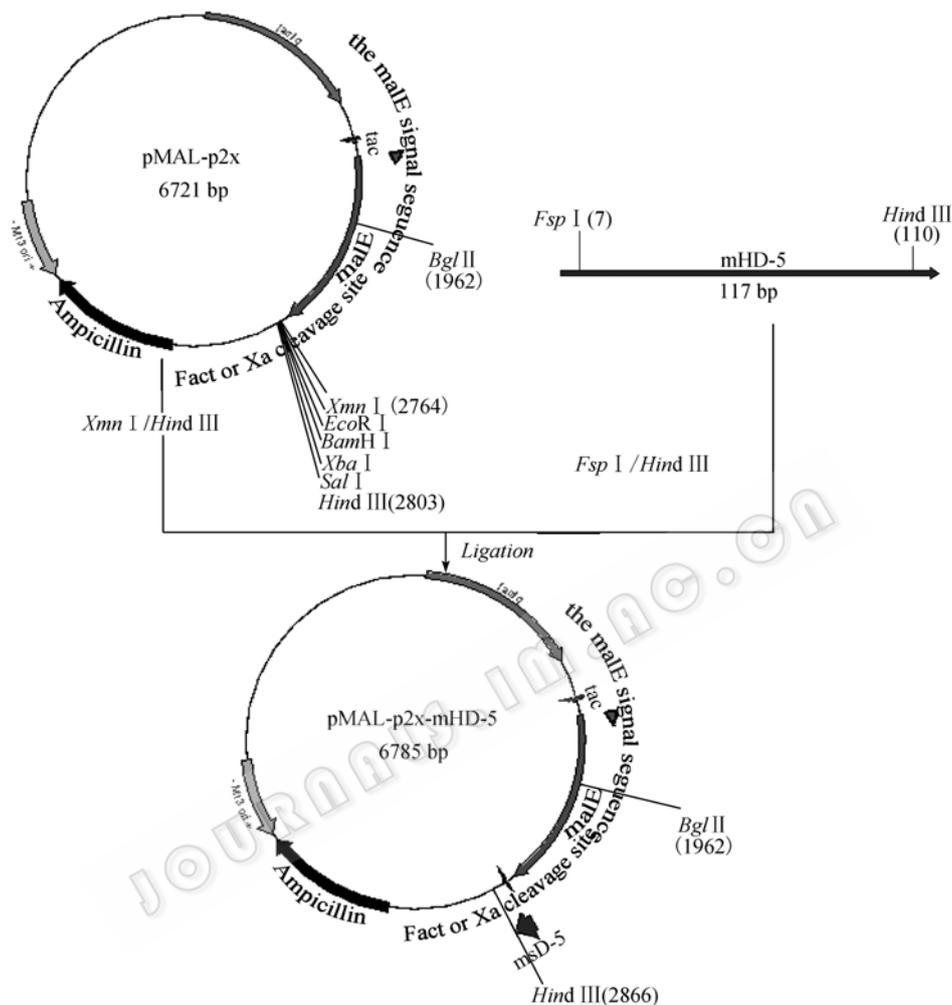


图 1 pMAL-p2x-mHD-5 构建示意图
Fig. 1 Construction of pMAL-p2x-mHD-5 vector

2 结果

2.1 mHD-5 序列克隆

用设计的 2 条寡脱氧核苷酸单链经 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳见约 120 bp 处有 1 条清晰带, 与预计大小相符(图 2)。

2.2 pMAL-p2x-mHD-5 重组质粒酶切鉴定

提取的可疑质粒用 *Bgl* II/*Hind* III 双酶切, 在 0.7% 琼脂糖凝胶电泳中见到约 6 kb 和 900 bp 两条带, 阳性重组子酶切出的小片段明显比空质粒酶切

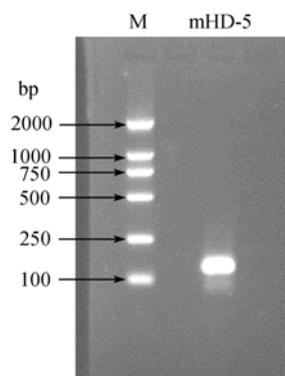


图 2 PCR 扩增 mHD-5
Fig. 2 mHD-5 was amplified by PCR

出的小片段约大 60 bp, 与理论计算值 64 bp 相符(图 3)。测序结果表明重组质粒序列与设计完全一致, mHD-5 阅读框正确插入表达载体。

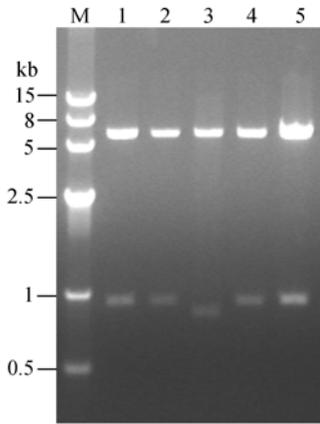


图 3 重组质粒酶切鉴定

Fig. 3 Digestion of pMAL-p2x-mHD-5 and pMAL-p2x
M: DNA marker; 1, 2, 4, 5: digested 4 clones of pMAL-p2x-mHD-5 by *Bgl* II/*Hind* III; 3: digested pMAL-p2x by *Bgl* II/*Hind* III

2.3 重组蛋白表达条件优化与目的肽纯化

从温度、IPTG 浓度和培养基成分 3 个因素优化目的蛋白的表达量。图 4 显示, 将转化含有正确重组质粒 pMAL-p2x-mHD-5 的 BL₂₁(DE₃)单克隆工程菌在 TB 培养基中 37 °C 培养 17 h 后, 稀释 50 倍扩繁 4 h, 然后加终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 在 25 °C 条件下诱导 20 h 获得了约 31% 的可溶性表达量(图 5 泳道 4)。破胞后的表达上清先经阴离子和亲和层析纯化获得纯度大于 95% 的重组融合蛋白(图 5 泳道 3)。融合蛋白经 *Factor* Xa 裂解释放出承载分子和小肽, 裂解效率接近 100%(图 5 泳道 2)。裂解液经强阳离子交换层析, 收集洗脱峰(图 6), 经透析脱盐和

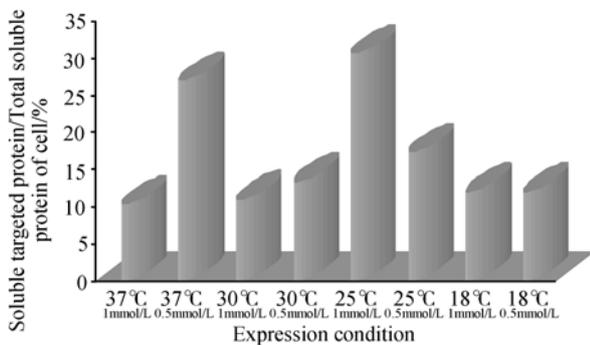


图 4 不同表达条件下可溶性融合蛋白的表达量

Fig. 4 Expression level of soluble fusion protein under different conditions

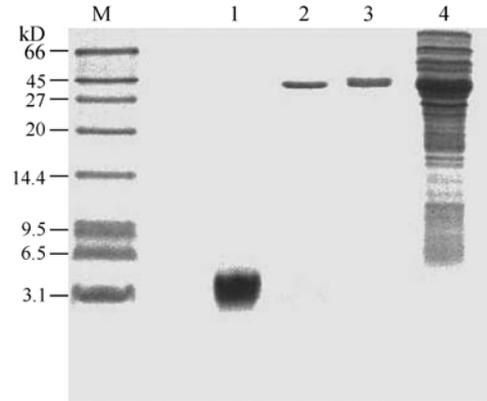


图 5 重组蛋白/多肽 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 5 Identification of recombinant protein and peptide by SDS-PAGE

M: protein marker; 1: purified rmHD-5; 2: digested fusion protein; 3: fusion targeted protein; 4: expression supernatant

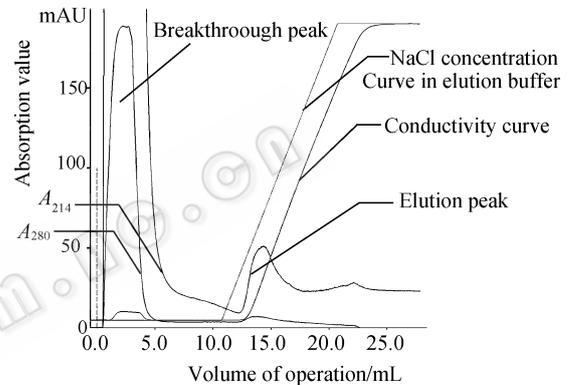


图 6 融合蛋白裂解体系中目的肽的阳离子(SP)交换层析纯化曲线

Fig. 6 Cation (SP) exchange chromatograph curve of purifying rmHD-5 in digested fusion protein solution

冷冻干燥, 获得最终产品 rmHD-5 肽(图 5 泳道 1)。rmHD-5 冻干产品的平均产率为 2.34 mg/L 菌液。

2.4 rmHD-5 活性鉴定

采用平板法测定 rmHD-5 对大肠埃希氏菌(ATCC 25922)和金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)2 种标准菌株的抗菌活性, 结果显示纯化所得 rmHD-5 对 ATCC 25922 具有较强的抑/杀能力, 对 ATCC 25923 的抑制作用相对较弱。采用液体培养法测定了该产品对 2 种菌株的抑制能力, 考察了从 1.95 μg/mL 至 500 μg/mL 的终浓度范围, 经 8 h 培养后, 测定 OD₆₀₀ 值。结果(图 7)表明, rmHD-5 在终浓度为 62.5 μg/mL 至 125 μg/mL 时可抑制 90% 以上 ATCC 25922 细胞的生长; 在终浓度为 500 μg/mL 时, 约 50% 的 ATCC 25923 细胞受到抑制。

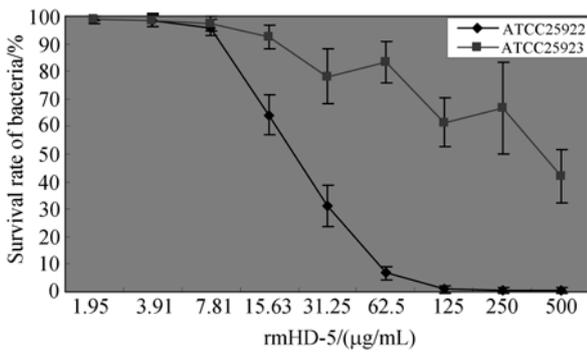


图 7 抗菌活性测定曲线

Fig.7 Antimicrobial activity curve of rmHD-5

3 讨论

越来越多抵抗传统抗生素的耐药致病菌株的出现已成为当前医学的一大难题。具有不易诱导产生耐药菌株的独特抑/杀微生物机制的抗菌肽, 不仅能直接杀灭细菌、真菌、原虫和病毒等多种致病微生物, 并且具有多靶向性和多作用途径的免疫保护作用, 因此可能成为新一代抗微生物药物^[8]。当前, 研究开发抗菌肽的主要任务仍然是寻求低成本获得高活性抗菌肽的工艺。为此目的, 本课题组以具有高效抑/杀细菌和抗病毒活性的人 α 防御素 5 为模式分子开展了相关的研究。

为了屏蔽抗菌肽自身对表达宿主菌的毒性作用和防止防御素因分子小易被蛋白酶所降解, 本研究选用融合表达的策略, 为成功表达奠定了基础。*malE* 基因源于细菌本身, 其蛋白(MBP)具有良好的可溶性, 故有利于提高融合靶蛋白的溶解性; 并且 MBP 是良好的分子伴侣, 有利于外源基因表达产物的稳定与胞内转运; 另外, MBP 属于带负电荷较多的蛋白, 可能会产生中和防御素正电荷的作用, 因而避免了表达的大量带正电荷的防御素多肽与宿主核酸相互作用引起的宿主细胞毒性和降低防御素表达量的现象^[10]; 同时, 含 MBP 的融合蛋白可利用已商业化的麦芽糖树脂进行亲和层析纯化; 因此 *malE* 基因可能是防御素融合表达合适承载分子。研究选用 pMAL-p2x 作为表达载体, 其不仅含有可作为承载分子的 *malE* 基因, 并且具有 MBP 蛋白的信号肽序列, 可将在胞质中翻译的融合蛋白分泌到能将巯基氧化为二硫键的周质环境中, 这有助于防御素空间折叠的形成, 避免了防御素因缺乏二级结构导致活性降低的可能。设计中, 作者选用生物活性最

强的 mHD-5 剪切体序列, 并应用密码子使用偏好原则选用了有利于大肠杆菌高效表达的密码子, 同时选用了合适的核酸限制性内切酶和切割位点刚好位于识别序列之后的 *Factor a* 作为融合蛋白的裂解酶, 成功构建可获得 mHD-5 天然序列的重组载体。为获得具有生物活性的 rmHD-5 创造了条件。

抗菌肽的高效表达已有成功的报道^[9], 但多数情况下目的蛋白是以包涵体的形式出现。目的蛋白形成了包涵体不仅给下游纯化带来了困难, 并且复杂而又低效的复性过程阻碍了获得具有正确折叠和高效生物活性重组防御素的效率。研究中, 作者优化了表达条件, 选用合适的表达温度、IPTG 浓度和营养丰富的培养基, 成功获得了可溶性的表达。小分子肽的纯化工艺也是防御素研发急需解决的问题, 作者分析了目的融合蛋白的生化特性并利用承载分子 *malE* 的亲合特性, 将诱导后的破菌上清先后经过阴离子交换层析和亲和层析获得了纯度大于 95% 的融合蛋白液。利用 mHD-5 具有较高的等电点($pI=8.58$), 在 pH 6.8 的 PB 缓冲体系中带正电荷, 应用强阳离子交换层析, 将其从含杂蛋白 MBP($pI=5.12$)的裂解融合蛋白体系中的分离出来, 同时去掉了极微量的 *Factor a*($pI=5.09$)。将经 UV214 在线监测洗脱峰收集液进行透析脱盐和冷冻干燥等精制过程, 成功获得 rmHD-5 冻干粉。活性测定结果显示 rmHD-5 对 G⁻菌 ATCC 25922 具有较强的抑/杀作用, 对 G⁺菌 ATCC 25923 的抑制作用较弱。与文献[4]报道的人工合成并经复性的 mHD-5 活性比较, rmHD-5 的活性略微偏低。可能原因是获得的 rmHD-5 尚未经反相层析精细纯化, 纯度不如人工合成肽; 另外, 重组基因大量而又快速地表达时, 部分蛋白未能形成正确的空间结构也可能是 rmHD-5 生物活性降低的原因。rmHD-5 具有对细菌的抑/杀活性可能机理是其带有的大量正电荷与带负电荷的细菌胞膜相互作用从而破坏了生物膜的结构与功能^[11, 12]。

研究结果表明采用可溶性的融合表达策略, 从原核表达系统获得具有生物活性的阳离子抗菌肽是防御素研发的有效途径之一。

REFERENCES

- [1] Seebah S, Suresh A, Zhuo S, *et al.* Defensins knowledgebase:

- a manually curated database and information source focused on the defensins family of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, 2007, **35**: D262–268.
- [2] Charles L Bevins. Defensin and innate host defence of the gastrointestinal tract. *Gut*, 1999, **45**: 911–915.
- [3] Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA, *et al.* Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproduction tract. *Am J Pathol.*, 1998, **152**(5): 1247–1258.
- [4] Ericksen B, Wu Z, Lu WY, *et al.* Antibacterial activity and specificity of the six human α -defensins. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 2005: 269–275.
- [5] Hiroki Tanabe, Andre J Ouellette, Melanie J Cocco, *et al.* Differential effects on human immunodeficiency virus type 1 replication by α -defensins with comparable bactericidal activity. *Journal of Virology*, 2004: 11622–11631.
- [6] Christopher B Buck, Patricia M Day, Cynthia D Thompson, *et al.* Humana-defensins block papillomavirus infection. *PNAS*, 2006, **103**(5): 1516–1521.
- [7] Ehsan Hazrati, Benjamin Galen, Wuyuan Lu, *et al.* Human α - and β -defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. *The Journal of Immunology*, 2006, **177**: 8658–8666.
- [8] Robert E W Hancock, Hans-Georg Sahl. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 2006: 1551–1557.
- [9] Rao XC, Li S, Hu JC, *et al.* A novel carrier molecule for high-level expression of peptide antibiotics in *Escherichia coli*. *Protein Expression and purification*, 2004, **36**: 11–18.
- [10] Lee JH, Minn I, Park CB, *et al.* Acidic peptide-mediated expression of the antimicrobial peptide buforin II as tandem repeats in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 1998, **12**: 53–60.
- [11] Leeuw E, Burks SR, Li XQ, *et al.* Structure-dependent functional properties of human defensin 5. *FEBS Letters*, 2007, **581**: 515–520.
- [12] Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacology*, 2003, **55**: 27–55.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

生态基因组学导论（注解版）

陈明生 葛颂 选译

978-7-03-020506-3 ¥58.00 2008年1月8日出版

本书介绍了一个非常前沿的领域——生态基因组学。这门学科将基因组学的研究手段和方法引入生态学领域，从基因组学的角度考察了三个生态学的基本问题：生态系统中群落的结构和功能、不同的生活史类型和变异以及生态位的界定。

虽然其内容主要来源于零散的第一手研究论文，但在作者的精心组织下，本书的前沿性和系统性得到了统一，适合作为本科生和研究生的参考用书。对生态学研究感兴趣的读者可以学习如何应用基因组学的技术深化生态学的研究；对其他学科（如分子生物学）有兴趣的读者可以学习生态学的基本概念和基础知识，以及如何将基因组学和生态学相结合，从而形成这门新的前沿交叉学科。



遗传多样性与作物病害持续控制

朱有勇 主编

978-7-03-020046-4 ¥88.00 2008年1月3日出版

本书是研究遗传多样性持续控制作物病害理论和实践的专著。全书共分12章，第1章简述了本领域的研究进展和发展趋势；第2、3、4章主要介绍了遗传多样性研究的相关分子生物学技术、研究方法和田间试验研究方法；第5、6、7章简述了抗病基因、致病相关基因及遗传多样性研究；第8、9章探讨了遗传多样性控制病害的遗传学和生态学基础；第10、11、12章介绍了遗传多样性品种搭配、种植模式的应用研究和技术示范推广。

本书内容广泛，从应用基础研究到示范推广，从实验室研究、田间试验到大田推广，较系统地介绍了遗传多样性控制作物病害的原理和方法，可供生物多样性、农业生物多样性、植物病理学、植物保护学、遗传多样性、作物栽培学、作物育种学和生物技术等专业的科研工作者，高等农业院校相关专业的教师、研究生、本科生，以及农业技术人员参阅。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：阮芯 联系电话：010-64034622（带传真）

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>，欢迎致电索要书目