

抗菌肽 CM IV 突变体基因在 *E. coli* 中融合表达的研究*

谢维 窦非 吴海宏 董雪吟 华子春 徐贤秀

(南京大学生物化学系, 医药生物技术国家重点实验室, 210093)

摘要 根据家蚕抗菌肽 CMIV 的氨基酸序列, 利用 *E. coli* 偏爱的密码子设计并合成其突变体 DNA, 克隆到融合表达载体 pEZ2318 中, 在 *E. coli* 中进行融合表达, 经亲和层析得到 26 mg/L 的融合表达产物。用化学方法裂解该融合表达产物, 得到了具有抗菌活性的突变体抗菌肽 CMIV。

关键词 抗菌肽 融合表达 *E. coli*

抗菌肽有潜在的重要临床价值, 但获得大量天然产物面临着巨大的困难, 因此人们对基因工程技术产生了极大的兴趣^[1]。迄今为止, 天蚕抗菌肽 A, B 已在昆虫系统^[2,3]中得到表达; 枣蚕抗菌肽 D, 绿蝇抗菌肽在酵母系统, 天蚕抗菌肽 A 在真核系统中表达研究也有报道^[4], 但尚未见在 *E. coli* 中表达成功的报道。

E. coli 表达系统是基因工程产业化中理想的系统。因 *E. coli* 培养方便, 周期短, 成本低廉而倍受人们的青睐。在 *E. coli* 中直接表达抗菌肽存在 2 个主要困难^[2]: (1) 表达产物对宿主菌有杀伤作用; (2) 缺乏酰胺化功能。为此, 本文通过融合表达途径和改造编码抗菌肽基因^[5]的办法, 试图在 *E. coli* 中表达出有活性的抗菌肽。

抗菌肽 CMIV 是我国学者^[6]从中国家蚕 (*Bombyx mori*) (浙农 1 号 × 苏 12) 中分离得到的一种新型抗菌肽, 它由 35 个氨基酸组成, 不含甲硫氨酸, C-末端为酰胺。体外实验表明, 从家蚕蛹中得到的抗菌肽 CMIV 具有较广泛的抗菌、抗病毒和杀伤某些肿瘤细胞的能力, 而不破坏人体正常细胞^[1]。基于抗菌肽 CMIV 这些功能和结构上的特点, 我们用化学方法合成了编码 C-末端带有天冬酰胺残基的突变体抗菌肽 CMIV 的 cDNA^[5], 并在 *E. coli* 中进行表达研究, 为进一步工业化生产抗菌肽打下基础。

金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (staphylococcal protein A, SPA) 具有和 IgG 亲和的功能。根据 SPA 和 IgG 亲和的结构域, Nilsson 等设计具有较完美独立结构的 ZZ 结构域, 并成功的实现了人 IGF-1 和 ZZ 结构域的融合表达^[7]。运用此表达体系能将表达产物分泌到培养基中, 便于

1995-11-22 收稿, 1996-05-06 收修改稿

* 江苏省科学技术委员会应用基础研究基金部分资助项目

1) 未发表资料

分离纯化。由于 ZZ 结构域自身结构比较完整,一般对与其融合的蛋白结构影响较小,因此可以表达具有生物活性的融合蛋白^[7]。但是,Moks 等^[8]运用此体系表达 IGF-1 发现融合蛋白 ZZ-IGF-1 没有生物活性。根据这一现象,我们选用了此表达体系,并首次成功地在 *E. coli* 中表达出了有生物活性的抗菌肽变体。

1 材料与方法

1.1 实验材料

质粒 pEZZ318 为瑞典 Nilsson 博士馈赠; *E. coli* JM109, HB101 为本实验室保存; SPA 单克隆抗体,南京铁道医学院微生物室陆全老师馈赠;家蚕抗菌肽 β 组分由南京师范大学生物系张双全老师馈赠;酶标羊抗鼠 IgG 为 Boehringer Mannheim 产品;4-氯-1-萘酚(4-chloro-naphthol, 4 CN)为 GIBCO BRL 产品; BSA 为 Sigma 产品;限制性内切酶 NdeI, NheI, AseI 及 T4 DNA 连接酶均为 New England Biolabs 公司产品;其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 中国家蚕抗菌肽 CMIV 变体 cDNA 的获得 参考文献[5]

1.2.2 质粒 DNA 的大量制备 采用热碱变性法^[9]

1.2.3 融合表达质粒的构建^[10] pUC9-CMIV 质粒中切下 EcoRI-BamHI 片段,直接插入表达质粒 pEZZ318 之 EcoRI-BamHI 中,阅读框不变,构成在 SPA 启动子(P_{SPA})控制下的 ZZ-CM IV 融合表达质粒 pEZZ318-CMIV,并转化 *E. coli* HB101。

1.2.4 ZZ-CMIV 融合蛋白的表达 挑新转化的 pEZZ318-CMIV/HB101 克隆,37℃ 培养过夜,次日再按照 1:50 转接 LB(Amp)液体培养基,37℃ 振摇 16 h,收集菌体与上清液,电泳或亲和层析。

1.2.5 SDS-PAGE 参照文献[10]

1.2.6 Western-blotting 分析^[10] SDS-PAGE 后,胶浸泡于转移缓冲液中(0.24% Tris, 1.153% 甘氨酸, 5% 甲醇 pH8.8),250 mA 电泳 1.5 h,将蛋白转至硝酸纤维素(NC)膜上,将 NC 膜浸于 Blocking buffer(1% 脱脂奶粉, 50 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 100 mmol/L NaCl)中,室温 2 h;加入抗 SPA 单克隆抗体,温育 1 h, PBS 洗膜 3 次,每次 10 min,加入 HRP 羊抗鼠 IgG (1:350)于 Blocking buffer 中继续保温 1 h,用 TBS(50 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 100 mmol/L NaCl)洗 3 次,每次 10 min,然后于新配制的 4 CN 显色液(10 mL 0.3% 甲醇 4 CN, 50 mL 0.01% H₂O₂)中显色。

1.2.7 亲和层析纯化融合蛋白^[8] 取偶联好的 IgG-Sepharose CL-4B 适量,装柱(2.0 × 10 cm),以 TST(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween 20)溶液平衡。取适量样品(菌体破碎液、培养上清液等)循环上样 2~3 次,分别以 TST, 1 mmol/L NH₄Ac (pH4.8)洗至基线,最后以 0.5 mol/L HAc pH2.8 洗脱,收集洗脱峰。

1.2.8 蛋白浓度测定 按 Folin-酚试剂法,以 BSA 作标准蛋白,绘制标准曲线,测定样品蛋白浓度。

1.2.9 CNBr 裂解融合蛋白^[11] 取亲和层析后的融合蛋白约 20 mg/管,溶解于 100 mL 裂解液(2 mol/L CNBr, 70% 甲酸),室温避光作用 24 h,加 20 倍水稀释终止反应,真空冷冻干燥。

1.2.10 亲和层析分离 CMIV 将经 CNBr 裂解的冻干粉, 用 TST 溶解后上样, 收集穿过峰.

1.2.11 重组抗菌肽 CMIV 抑菌活性试验 参考 Hultmark^[12]方法, 以 TNF/CNBr 裂解物作阴性对照.

2 结果与分析

2.1 融合表达质粒 pEZZ318-CMIV 的构建与筛选

克隆在 pUC9 中的 CMIV 经 EcoRI, BamHI 双酶切, 与经同样酶切后的 pEZZ318 载体连接, 可以保持阅读框不变, 形成 ZZ 结构域和 CMIV 基因的载体(如图 1), 连接产物转化 JM109, 挑选白色克隆质粒进行限制性内切酶鉴定、筛选, 得到阳性重组质粒 pEZZ318-CMIV.

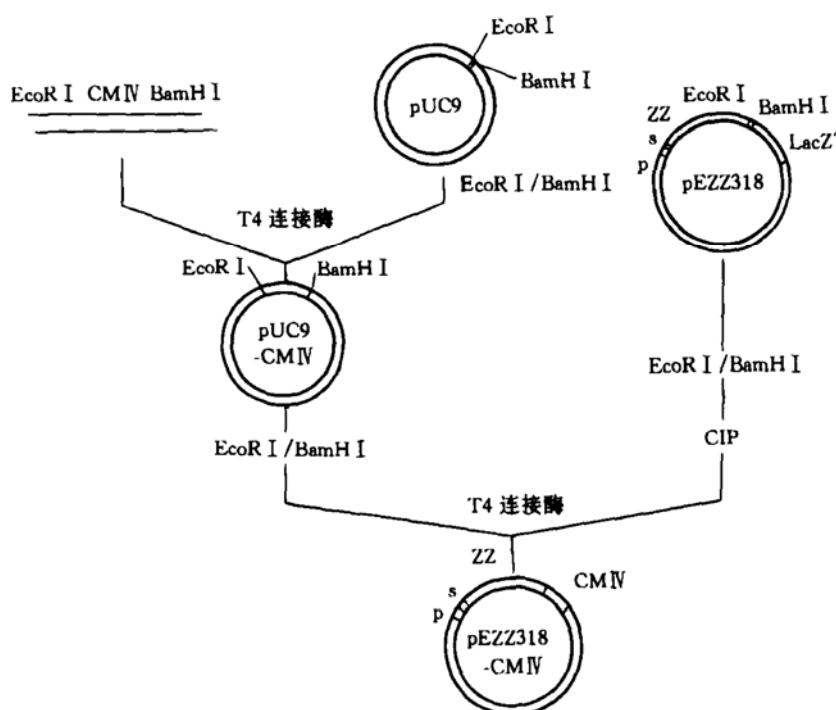


图 1 融合表达载体 pEZZ318-CMIV 的构建

2.2 pEZZ318-CMIV 在 *E. coli* HB 101 中的表达与鉴定

pEZZ318-CMIV 转化 HB101, 挑阳性克隆于含 Amp 的 LB 培养基中 37℃ 振荡培养 16 h, 收集菌体和上清液. 菌体走 15% SDS-PAGE, 凝胶经考马斯亮蓝 R250 染色, 可见重组质粒 pEZZ318-CMIV 在 HB101 中有表达, 与空载质粒 pEZZ318/HB101 比较, 在 22 ku 处多出 1 条蛋白带, 而在 30 ku 附近少 1 条带(如图 2). 根据基因长短计算, 空载质粒 ZZ 与 lacZ' 融合, 可翻译出 233 个氨基酸残基的融合蛋白, 约 26 ku. 而重组质粒中 CMIV 取代了 lacZ', 可翻译出 202 个氨基酸残基的融合蛋白, 约 22 ku. 实验结果与理论计算相一致. 用抗 SPA 单克隆抗体对表达产物作 Western blotting 分析, 结果(如图 3)可见空载质粒菌在 30 ku 和 15 ku 处有 2 条主要带, 在 30~14 ku 之间还有若干次要带. 而重组质粒仅在 22 ku 和 14 ku 处出现 2 条带, 表明这些蛋白中均有 ZZ 结构域存在.

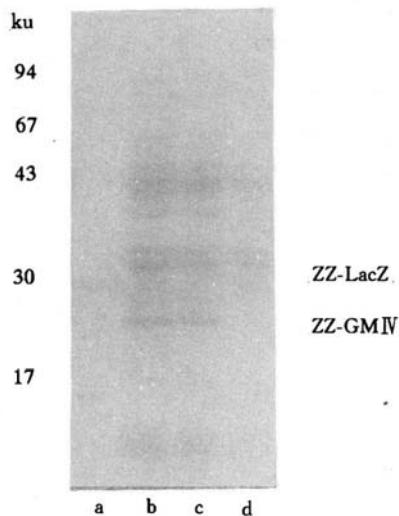


图 2 表达质粒菌体还原型 SDS-PAGE
a 为分子量标准; b, c 为 pEZZ318-CMIV; d 为 pEZZ318
(对照)

2.3 融合表达产物的分离、纯化

将含重组表达质粒菌的菌体经 TST 悬浮, 超声破碎后上亲和柱, 用 0.5 mol/L 醋酸(pH2.8)洗脱, 收集洗脱峰(图 4). 上清液则加 pH7.4 的 Tris-HCl 到终浓度为 50 mmol/L, 0.05% Tween20 上样, 以同样条件洗脱. 洗脱物用还原型 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色. 有 3 条带, 大小在 14~18 ku(如图 5). 通过 Folin-酚法测定蛋白质浓度, 表明此条件下可得到 26 mg/L 的融合表达产物, 其中 11 mg 来自培养基中.

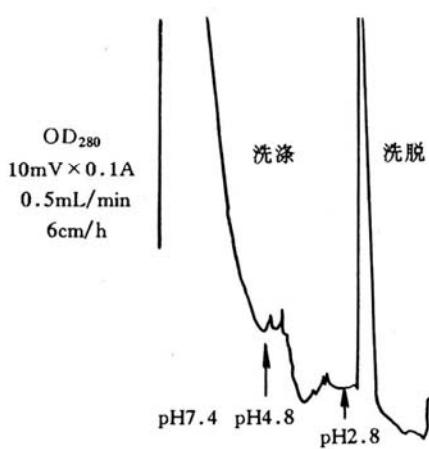


图 4 融合蛋白亲和层析

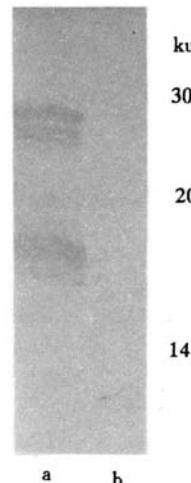


图 3 Western blotting 分析(以抗 SPA 单克隆抗体为一抗)
a 为 pEZZ318/HB101, b 为 pEZZ318-CMIV/HB101

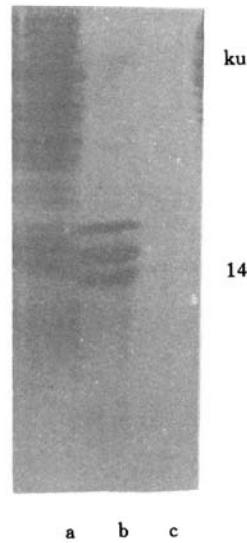


图 5 亲和层析洗脱物还原型 SDS-PAGE
a 为 pEZZ318-CMIV/HB101, b 为纯化的融合蛋白, c 为 CNBr 裂解产物

2.4 CNBr 裂解产物的生物学活性

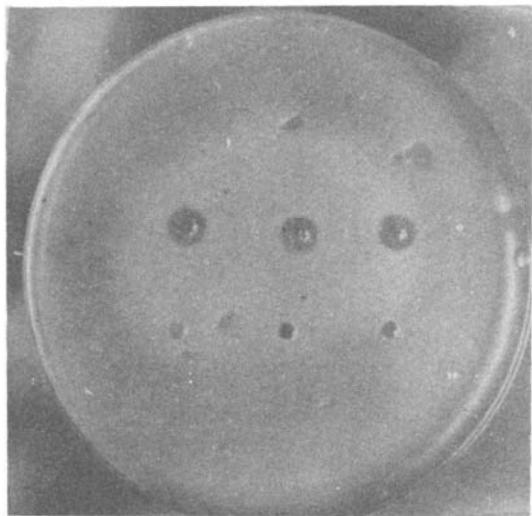


图 6 裂解产物抑菌圈试验
上排为融合蛋白,下排为裂解产物

亲和层析洗脱产物,经冷冻干燥后直接溶于 70% 甲酸中,经 CNBr 避光裂解 24 h 后,用 20 倍水稀释终止反应,冻干。冻干粉加 H₂O 溶解。裂解物经还原性 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色,有 1 条 14 ku 带,相当于亲和层析洗脱物 3 条带中最小白带。平板测活表明裂解物具有明显抑制 *E. coli* K12 D31 生长活性(图 6)。

3 讨论

本文通过融合表达的方式将化学合成的抗菌肽 CMIV 基因克隆到 *E. coli* 的表达系统中获得了融合蛋白,并通过 CNBr 裂解获得了有抗菌活性的表达产物。

由于抗菌肽的强而广谱的抗菌能力,不可能直接在细菌体系中表达抗菌肽^[2],为此,考虑到用 pUC9 作为克隆载体,我们在设计基因时有意识地让 CMIV 基因反向插入 pUC9,以避免对宿主菌潜在的毒性,实际上这种毒性在我们的实验中得到了证实。*pET11c* 是一种可诱导的高效表达载体,*T7* 启动子下游的 1ac 0 位点受克隆于同一质粒中的 1ac Iq 基因产物的阻遏,保证其有严格的诱导开启功能。理论上讲可以瞬时表达对细胞有毒性的基因产物^[13]。我们曾试图将 CMIV 基因直接插入 *pET11c* 之 NdeI, BamHI 位点之间。但是,即使不加诱导物(IPTG)也未能得到重组克隆(重复 3 次),表明 CMIV 对 *E. coli* 有极强的杀伤力,极低水平的渗漏都会抑制细菌生长,证明的确不能直接在 *E. coli* 中表达抗菌肽 CMIV。

ZZ 结构域基因是根据金黄色葡萄球菌 A 蛋白(SPA)的 IgG 结合结构域设计的合成基因,它和 SPA 的信号肽(S)融合,可受 SPA 启动子的启动表达并分泌 ZZ 结构。人 IGF-1 和 ZZ 结构融合在 *E. coli* 中也获得了很好的分泌型表达^[8,14]。将抗菌肽 CMIV 和 ZZ 融合,转化 *E. coli* HB101,也获得了融合表达,并在菌体和培养液中都检测到了融合产物,但分泌到培养基中的效率不高(40%)。这是否因为 CMIV 的等电点高,与酸性的 ZZ 结合紧密而影响了分泌,尚不清楚。不论融合产物在胞内还是在培养基中,均未见抑菌活性,这一结果与 Moks^[8] 的结果一致。但是本实验室在用此体系表达 pro-UK 时,发现融合产物具有完全的生物学活性^[15],其差别的原因不明,推测可能是 pro-UK 分子量大,高级结构稳定,其活性构象不易受 ZZ 之影响。

将抗 SPA 单克隆抗体所作的 Western blotting 分析菌体总蛋白的结果进行比较,看到 2 条主要蛋白带含有 ZZ 结构,大小为 22 ku(SZZ-CMIV)和 14 ku(ZZ)。这表明 ZZ-CMIV 和 ZZ-IGF-1^[8]像融合蛋白一样,有降解现象存在。一般来说,像抗菌肽之类结构的多肽,水溶液中没有稳定的高级结构,在异体中极易被降解,融合表达是增加其稳定性的重要途径^[2,14]。从本实验结果看,仍有少量降解。

由于 CMIV 中没有甲硫氨酸(Met),在其 N 端设计了一个甲硫氨酸为其融合表达产物的裂解提供了化学途径。在 70% 甲酸环境中用 CNBr 对融合表达产物进行裂解,裂解产物显示

了抑制 *E. coli* K12 D31 生长的活性。为了排除甲酸或 CNBr 的抑菌作用, 设置了阳性、阴性对照, 结果表明我们所测到的抑菌活性与使用甲酸和 CNBr 无关, 重组型抗菌肽与天然抗菌肽的抗菌活性相当。

C-末端酰胺化是许多破坏膜的多肽, 如 melittin, sarcotoxin 以及许多多肽激素的常见特征。有人认为 C-末端酰胺化并非抗菌肽抗菌活性所必需, 也有人认为 C-端酰胺化是抗菌肽完全功能所不可缺少的^[2]。为了模拟天然抗菌肽, 解决 *E. coli* 无翻译后酰胺化修饰之问题, 在 CMIV 终止密码子前设计一个天冬酰胺密码子 AAC, 以便直接翻译出 C-末端带酰胺的多肽。这种 β 位酰胺基团与天然抗菌肽中 α 位酰胺基团对抗菌活性作用的差异, 有待进一步研究。但从表达产物的抑菌活性可以得出这样的结论: 由基因直接编码出 C-末端带有酰胺基团的抗菌肽 CMIV, 具抗菌活性, 在 *E. coli* 中可以表达抗菌肽。

参 考 文 献

- 1 张双全, 屈贤铭, 戚正武. 昆虫免疫应答及抗菌肽应用前景. 生物化学杂志, 1987, 3(1): 11~18
- 2 Andersons D, Engstrom A, Josephson S, et al. Biologically active and amidated cecropin produced in a baculovirus expression system from a fusion construct containing the antibody-binding part of protein A. Biochem J, 1991, 280: 219~224
- 3 Hellers M, Gunne H, Steiner H. Expression and post-translational processing of preprocecropin A using a baculovirus vector. Eur J Biochem, 1991, 199: 435~439
- 4 马礼金, 庄楚雄, 黄自然, 等. 柞蚕抗菌肽 D 转基因酵母及表达产物的分析. 蚕业科学, 1995, 21: 43~45
- 5 谢维, 邱奇峰, 陈江宁, 等. 中国家蚕抗菌肽 CMIV 基因的化学合成与克隆. 南京大学学报(自然科学版), 1996, 32(3): 474~477
- 6 屈贤铭, 吴克佐, 邱雪贞, 等. 经聚肌胞苷酸诱导家蚕蛹血淋巴中六种抗菌肽的分离与鉴定. 生物化学与生物物理学报, 1986, 18(3): 284~291
- 7 Nilsson B, holmgren E, Josephson S, et al. Efficient secretion and purification of human insulin-like growth factor I with a gene fusion vector in staphylococci. Nucleic Acids Res, 1985, 13: 1 151~1 162
- 8 Moks T, Abrahmsen L, Holmgren E, et al. Expression of human insulin-like growth factor I in bacteria: use of optimized gene fusion vectors to facilitate protein purification. Biochemistry 1987, 26: 5 239~5 244
- 9 Sun N E, Shen B H, Zhou J M, et al. An efficient method for large-scale isolation of plasmid DNAs by heat-alkali co-denaturation. DNA Cell Biol, 1994, 13: 83~86
- 10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 11 Hammarberg B, Nygren P A, Holmgren E, et al. Dual affinity fusion approach and its use to express recombinant human insulin-like growth factor II. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 4 367~4 371
- 12 Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, et al. Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from cecropia pupae. Eur J Biochem, 1982, 127: 207~217
- 13 Doherty AJ, Connolly B A, Worrall A F. Overproduction of the toxic protein bovine pancreatic DNase I, in *E. coli* using a tightly controlled T7-promoter-based vector. Gene, 1993, 136: 337~340
- 14 Uhlen M, Moks T. Gene fusions purpose of expression: an introduction. Methods in Enzymology, 1990, 185: 129~143~
- 15 Hua Z, Li J, Zhu D. Expression of a fibrinolytically active human pro-urokinase fusion protein in *E. coli*. Biochem and Molecular Biol International, 1994, 33: 1 215~1 220