文章编号:1000-5404(2005)08-0697-03

论著

带J链的α-防御素-1的基因重组和表达载体的构建

刘贤华[1],白晓东[2],粟永萍[1],艾国平[1],张韶峰[2] ([1]第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,创伤、烧伤、复合伤国家重点实验室重庆 400038; [2]中国人民武装警察部队总医院烧伤外科,北京 100039)

提 要: 目的 将α-防御素-1(HNP-1)改建为一种杀菌分子J链α-防御素-1(J-HNP-1),这种杀菌分子具有与细胞膜上具备的多聚IgA受体(PIgR)相结合而进入粘膜上皮细胞的能力,发挥其杀菌作用。即克隆人J chain-HNP-1嵌合基因DNA,并构建真核表达载体。**方法** 将从pCH质粒中获取的J链片段,采用人工连接方法与HNP-1片断相连接,并将其构建于新型哺乳动物细胞质粒表达载体pcDNA3.1(-)/Myc-HisC中,进行序列测定。**结果** 经过重组得到的J链防御素-1的目的片断为786 bp,序列分析与GenBank中报道的编码J链及HNP-1成熟肽的序列完全一致。**结论** J chain-HNP-1嵌合基因DNA的克隆和哺乳动物细胞表达载体的构建,为进一步进行抗菌肽的研究及制备奠定了基础。

关键词: 基因重组;抗菌肽;J链;α-防御素-1
中图法分类号: Q516; Q782; Q784 **文献标识码**: A

Recombinant of J chain-HNP-1 cDNA and the construction of expression vector

LIU Xian-hua[1], BAI Xiao-dong[2], SU Yong-ping[1], AI Guo-ping[1], ZHANG Shao-feng[2] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Burn Surgery, General Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Beijing 100039, China)

Abstract: Objective To construct J-HNP-1 cDNA recombinant and the eukaryotic expression vector for the reconstruction of J-HNP-1 protein which can combine with PIgR on the mucous cell membrane, penetrate into cells and kill the intracellular microorganism. **Methods** J chain cDNA from pCH plasmid was connected to HNP-1 cDNA from pBabeNeo plasmid by PCR, then the recombinant cDNA was inserted into the expression vector pcDNA3.1(-)/Myc-HisC. The direction and sequence in the vector was determined by sequence analysis. **Results** The recombinant J-HNP-1 cDNA was 786 bp and in accordance to J chain and HNP-1 cDNA of GenBank. **Conclusion** The recombinant J-HNP-1 cDNA and the construction of expression vector is the basis for the new bactericidal peptide production.

Key words: recombinant; antimicrobial peptide; J chain; HNP-1

抗生素在抗感染领域中一直发挥着巨大作用。但由于各种原因,例如细菌的变异、抗生素的滥用等造成细菌对传统抗生素的耐药却一直困扰着整个医学界。人们一直尝试着各种途径去解决这一难题,目前抗菌肽的研究成为热点之一。抗菌肽的种类很多,但防御素是近几年来最引人关注的。防御素(defensin)是一大类家族,广泛存在于昆虫、低等脊椎动物及哺乳动物,属于30~35个氨基酸组成的阳离子多肽。最初从兔和人类的白细胞中发现,并逐渐证实其它动物亦有相同的多肽物质。体内分布以中性粒细胞为主,属胞内抗菌物质;肠粘膜潘氏细胞亦发现含有防御素多肽[1]。体外实验证实,防御素通过攻击靶细胞膜而杀菌,可有效杀灭真菌和细菌。近期表明,胃上皮细胞在细菌感染时亦表达防御素多肽[2],但是粘膜上皮细胞并不具备中性粒细胞的胞内杀菌能力。因此,我们设计本实验,将α-防御素-1(HNP-1)进行分子改建,使HNP-1带有J链分子,J链分子与细胞膜上多聚IgA受体(PIgR)结合,从而使防御素能顺利进入细胞内发挥杀菌作用。同时,将此种含J链的HNP-1构建于哺乳动物细胞表达载体pcDNA 3.1(-)/Myc-HisC中,使其表达产物易于被检测和分离纯化,为进一步利用真核细胞表达活性J链HNP-1打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大肠杆菌 菌株TOP10购自北京天为时代生物公司。1.1.2 质粒 pCH-J chain质粒由挪威奥斯陆大学Johansen教授惠赠[3];人防御素真核表达质粒pBabeNeo-HNP-1由华西医科

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(3023060),国家自然科学基金资助面上项目(300100197)
Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China (3023060, 300100197)

作者简介:刘贤华(1971-),女,湖北省洪湖市人,硕士研究生,实验师,主要从事抗感染方面的研究。电话:(010)88276752

收稿日期:2004-11-18;**修回日期**:2005-02-04

大学王伯瑶教授惠赠；哺乳动物细胞质粒表达载体 pcDNA3.1(-)/Myc-HisC 购自 INVITROGEN 公司。

1.1.3 酶类及主要试剂 限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ为华美公司产品；T4 DNA Ligation、DNA marker DL2000、DNA 凝胶回收试剂盒为北京天为时代生物公司产品；质粒提取试剂盒为 Promega 公司产品；LB：胰蛋白胨 10 g/L，酵母粉 5 g/L，NaCl 10 g/L；pH 7.5。

1.2 方法

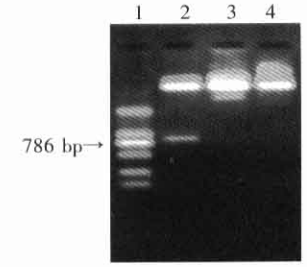
1.2.1 J-HNP-1 DNA 片段的制备 ①J 链的 PCR 扩增：引物：5′-GGA TCC ATG AAG AAC CAT TTG CTT；3′-ACC ACC GTC AGG-ATA GCA GGC ATC；提出 pCH-J chain 质粒为模板，变性，扩增，常规方法。产物：489 bp。在上游引入 *Bam*H Ⅰ位点，下游引入 2 个甘氨酸分子片段。②HNP-1 DNA 的 PCR：引物：5′-GGT GGT-ATG AGG ACC CTC GCC ATC；3′-GGA TCC TCA GCA GCA GAA-TGC CCA；在上游引入 2 个甘氨酸分子片段，下游引入 *Bam*H Ⅰ。以载体 pBabeNeo-HNP-1 质粒为模板进行扩增。③扩增片断的连接与转化：J chain 与 HNP-1 DNA 采用 DNA 连接酶连接，转化，挑取阳性克隆，摇菌，提取质粒 ，送上海生物工程公司测序。证实片段为 5′-J chain-HNP-1-3′顺序，片段大小为 786 bp。*Bam*H Ⅰ片段经克隆入 PUC18 质粒。

1.2.2 哺乳动物细胞表达载体的构建 ①PUC18 质粒用 *Bam*H Ⅰ酶切，1.0%琼脂糖凝胶电泳，用 DNA 凝胶电泳回收试剂盒回收 J chain-HNP-1 DNA 片段。②哺乳动物细胞质粒表达载体 pcDNA3.1(-)/Myc-HisC 用限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ酶切、电泳、回收。由于载体 DNA 具有两个相同的粘端，需按此方法用磷酸酶处理：DNA 溶液 10～40 μl (2～40 μg)，10× Reaction Buffer 5 μl (0.1 mol/L Tris. Cl pH 7.5，0.1 mol/L $MgCl_2$)，加 ddH_2O 到 49 μl，CIAP 酶 1 μl (1 U/μl)，总体积 50 μl；37 ℃ 30 min；85 ℃ 15 min 灭活 CIAP 酶；1.0%琼脂糖凝胶电泳，然后用 DNA 凝胶电泳回收试剂盒回收载体 DNA。③将 J chain-HNP-1 外源性片断插入到哺乳动物细胞表达载体 pcDNA3.1(-)/Myc-HisC 的多克隆位点并紧邻报告基因 Myc 表位和 His6 的上游。从而构建重组哺乳动物细胞表达载体 pcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1。方法如下：以上回收产物按载体/插入片断 1∶3～1∶6 取样，T4 DNA Ligation 1U，10×连接缓冲液 1 μl，反应总体积为 10 μl，25 ℃ 0.5～2 h。取 5 μl 连接反应物转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞，并接种于含 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基过夜培养，经篮白筛选获得阳性重组子。随机挑取 3 个阳性克隆，LB 液体培养基培养过夜。④用 Promega 质粒提取试剂盒从转化大肠杆菌 TOP10 提取重组片段 J-HNP-1，经 *Bam*H Ⅰ酶切鉴定，并由北京军事医学科学院应用 Beckman CEQ2000 自动测序仪进行 DNA 序列测定。用于 rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-测序引物：正向引物为 T7：5′-TAATACGACTCACTATAGGG-3′；反向引物为 BGH-rev：5′-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3′。

2 结果

2.1 阳性重组子 rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1 的筛选

阳性重组子 rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1 经 *Bam*H Ⅰ酶切后，可见大小约 786 bp 的目的片断(图 1)。



1：DNA marker DL2000；2：pcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1/*Bam*H Ⅰ；3：pcDNA3.1(-)/Myc-HisC/*Bam*H Ⅰ；4：pcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1

图 1 重组质粒 pcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1 的酶切鉴定

Fig 1 Restriction of recombinant plasmid pcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1

2.2 阳性重组质粒 rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1 的 DNA 序列测定

pcDNA3.1(-)/Myc-His 质粒具有氨苄青霉素抗性基因，用重组质粒 rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1 转化感受态大肠杆菌，所获转化子具有抗氨苄青霉素特性。将连接后得转化子接种于含 100 μg/μl 氨苄青霉素 LB 培养基。过夜培养后，观察到有数个可能得阳性重组子菌落形成。随机挑取 3 个阳性克隆提取质粒 DNA，并对克隆 1 的质粒进行 DNA 测序。由于载体两端酶切位点一样，且插入片断较长，因此采取正向引物与反向引物双向测序。测序结果显示：使用正向 T7 引物和反向 BGH-rev 引物对重组质粒 rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1 进行 DNA 序列测定，插入片断为 786 bp，且为正向插入，其中 J-HNP-1 DNA 序列与 GenBank 数据库报告的 J-HNP-1 DNA 序列同一性为 100%。该结果表明：所提质粒为 rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1 转化的阳性重组子。

重组质粒 rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1 中 J-HNP-1 插入子的 DNA 序列分析如下：

*Bam*H Ⅰ 起始密码

GGA TCC ATG AAC CAT TTG CTT TTC TGC GGAGTC CTG GCG GTT

TTT ATT AAGGCT GTT CAT GTC AAA …… GAACGT CGC TAT GGA ACC

终止密码 *Bam*H Ⅰ

TGC ATC TAC CAG GGA TGC TGA GGA TCC (786 bp)

3 讨论

防御素广泛存在于许多动物和植物体内。根据来源，可将防御素分为昆虫防御素、植物防御素和哺乳动物防御素，而我们关注的是动物防御素。动物防御素根据结构可分为 α 防御素和 β 防御素，它主要来源于皮肤、呼吸道等的上皮组织[4,5]，遇到病原微生物刺激时表达增强，是机体抵抗病原微生物入侵的重要免疫屏障。近几年随着研究的不断深入，证实防御素不仅具有广谱抗菌作用，而且还具有抗病毒和非特异抗细

胞毒作用。目前,妨碍防御素应用的困难主要是防御素的制备问题。由于人体正常组织中防御素的含量低,分离纯化的难度较大,通过提取所获得的防御素的量是极为有限的,而化学合成又成本太高,耗资巨大,因此,通过基因工程技术来获得大量的抗菌肽防御素是首选。HNP-1[6], HNP-2[7], HNP-3[8] 等在大肠杆菌中的成功表达,HBD-1 在昆虫中的表达,为大量制备防御素奠定了良好基础。早在 1993 年就有研究报道用质粒表达防御素 HNP-1, 但是所表达的 HNP-1 不具有杀菌活性。国内近年来也有在大肠杆菌中表达的文章报道,但是表达产物的杀菌活性并未得到证实。目前国内对防御素的研究主要集中在基因重组阶段。对于后基因组阶段的分子改建研究少有报道。而我们的实验则考虑到防御素主要存在于肠道、女性生殖道粘膜系统中,而粘膜上皮细胞又有一个共同的特点,即在细胞膜上具备多聚 IgA 受体(PIgR)。连有 J 链的 IgA 分子通过 J 链与 PIgR 结合[9], 后将 IgA 分子转入粘膜细胞中。而针对细菌移位细胞内途径进行有关防治方面的研究少有报道。

有研究证实[10]:经 PIgR 转入细胞内的 IgA 在细胞内可与胞内感染微生物作用,Bout 等[11] 接着发现:IgA 分子的胞内转运过程中同样可以抑制细胞内寄生虫的生长。这一重要发现表明:经 PIgR 转入细胞内的分子在胞内骨架系统的作用下,可与胞内感染的微生物作用。基于此种现象,我们将 HNP-1 改建为一种杀菌分子,分子的一端为 J 链,另一端为防御素,称之为多聚 IgA 受体(PIgA) 配体样杀菌肽。这种外源性防御素借助于 J 链的作用被送入粘膜上皮细胞内,使粘膜上皮获得象中性粒细胞一样的杀菌功能,从而杀灭细胞内移位菌。本实验克隆了 J-HNP-1 分子,同时将其构建到 pcDNA3.1(-)/Myc-HisC 中。pcDNA3.1 为高效哺乳动物细胞表达载体,带有双重标签基因 *Myc* 和 6×His,能够在大多数哺乳类细胞内高水平地稳定表达。我们将经过改构的杀菌肽分子 J-HNP-1 全长 DNA 片段插入到 pcDNA3.1(-)/Myc-HisC 质粒的多克隆位点,并紧邻该质粒的 Myc 表位和 6×His 标签基因的上游。由于双重标签基因 Myc 和 6×His 与 J-HNP-1 基因共同享有同一个启动子 CMV,所以只要 rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1 成功地被转染到特定的表达细胞,那么由 CMV 启动子驱动的基因片段则有可能被转录并被翻译成为 J-HNP-1/Myc-His 嵌合肽,它是由 J-HNP-1 与 6 个组氨酸组成的嵌合肽,而 6×His 起着检测标志的作用,使 J chain-HNP-1 的表达产物易于被检测和分离纯化。更为重要的一点就是双重标签基因 Myc 和 6×His 位于嵌合肽的下游,从而避免了因其表达产物在胞内加工修饰而丢失,从而保证了在蛋白质水平检测 J-HNP-1 在细胞内及细胞外表达结果的可靠性与真实性。正基于以上原因,我们将 J chain-HNP-1 构建于哺乳动物细胞表达载体 pcDNA3.1(-)/Myc-HisC 质粒中,使 J chain-HNP-1 的表达产物易于被检测和分离纯化,为以后的研究工作打下基础。

参考文献:

[1] Mallow E B, Harris Ann, Salzman N, *et al*. Human enteric defensin, gene structure and developmental expression[J]. J Biol Chem, 1996, 271(8): 4038 - 4045.

[2] O'Neil D A, Cole Sp, Martin P E, *et al*. Regulation of human beta defensin by gastric epithelial cells in response to infection with Helicobacter pylori or stimulation with interlukin-1[J]. Infec Immun, 2000, 68(9): 5412 - 5415.

[3] Johansen F E, Norderhaug I N, Ree M, *et al*. Recombinant expression of polymeric IgA: incorpration of J chain and secretory component of human origin[J]. Eur J Immunol, 1999, 29(5): 1701 - 1708.

[4] Fellermann K, Stange E F. Defensins-innate immunity at the epithelial frontier [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2001, 13(7): 771 - 776.

[5] Sela B. Defensins of innate immunity serving as furst-line antimicrobial defense[J]. Harefuah, 2002, 139(3-4): 112 - 116.

[6] Piers K L, Brown M H, Hancock R E W. Recombint DNA procedures for producing small natimicrobial cationic peptides in bacteria [J]. Gene, 1993, 134(1): 7 - 13.

[7] Fang X M, Shu Q, Chen Q X, *et al*. Differential expression of alpha-and beta-defensins in human peripneral blood[J]. Eur J Clin Invest, 2003, 33 (1): 82 - 87.

[8] Harder J, Bartels J, Christophers E, *et al*. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic[J]. J Biol Chem, 2001, 276(8): 5707 - 5713.

[9] Johansen F E, Natig Norderhaug I, Roe M, *et al*. Recombinant express of polymeric IgA: incorporation of J chain and secretory component of human origin[J]. Eur J Immunol, 1999, 29(5): 1701 - 1708.

[10] Burns Jw, Siadat P M, Krishnaey A A. Protective effect of rotavirus Vp6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizating activity[J]. Science 1996, 272(5258): 104 - 107.

[11] Bout D, Moretto M, Dimier P I, *et al*. Interaction between Toxoplasma gondii and enterocyre[J]. Immunobiology, 1999: 201(2): 225 - 228.

(编辑　陈聪连)