论著

文章编号:1000-5404(2006)20-2020-04

改良人源杀菌肽LL-37的两种构建及表达方法的对比研究

杨艳丽,葛晓冬,刘友生,邹 佳 (第三军医大学西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要: 目的 将改良人源杀菌肽LL-37(rLL-37)用两种方法构建,并分别在原核细胞中融合表达,以寻找较好的制备方法。**方法** ①将编码rLL-37基因序列放入载体pET-28a(+),构建表达质粒pET-28a(+)-rLL-37,并于工程菌BL21(DE3)中融合表达、纯化;②将编码rLL-37基因序列中的部分原核细菌稀有密码子替换为原核细菌偏爱密码子,并在其N端加入一段编码带负电荷的承载蛋白(carrier protein molecule, CPM)基因序列,构建表达质粒pET-30a(+)-CPM-rLL-37,并于工程菌BL21 Star(DE3)中融合表达、纯化。对比上述2种方法rLL-37的制备率,并初步研究其抗菌性。**结果** 通过Touch-Down PCR法成功获得rLL-37多肽的DNA序列,质粒pET-28a(+)-rLL-37于杆菌BL21(DE3)中表达,融合蛋白约占全菌蛋白的20%,并成功由强阳离子交换柱芯Macro-Prep High S纯化;设计了一段含28个氨基酸残基的CPM(pHi 2.7、pH 7.4时电荷为-6.0),成功构建表达质粒pET-30a(+)-CPM-rLL-37,并于杆菌BL21 star(DE3)中表达,融合蛋白约占全菌蛋白的35%,并被TALON亲和柱芯有效纯化。经抑菌圈实验证明两种方法所获得的rLL-37多肽对G^+、G^-菌都具有较好的杀菌力。**结论** rLL-37在原核细胞中的高效表达,为深入研究rLL-37的杀菌活性奠定了基础。

关键词: LL-37;蛋白质融合表达;承载蛋白

中图法分类号: Q516;Q591.2 **文献标识码**: A

Comparison of 2 kinds of construction and expression methods of reconstructed human cathelicidin LL-37

YANG Yan-li, GE Xiao-dong, LIU You-sheng, ZOU Jia (Department of Pathology, Southwest Hospital, Third military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To employ 2 approaches to construct and express reconstructed LL-37 (rLL-37) in procaryotic system, and to explore a better preparation method. **Methods** The first method: the rLL-37 was inserted into vector pET-28a (+), then was induced to express in *E. coli*. BL21 (DE3) and purified by chromatography; the second method: the rare codons in the rLL-37 gene sequence were substituted by the preferred codons of procaryotic cell, and a fragment of carrier protein molecule (CPM) was added to the N termination of the objective sequence to construct expression plasmid pET-30a(+)-CPM-rLL-37, then the rLL-37 was expressed in *E. coli*. BL21 Star(DE3) and purified by chromatography. The productive rates of the 2 methods were compared and the antimicrobial effects of obtained rLL-37 was studied. **Results** The first method: the DNA sequence of rLL-37 was obtained successively by Touch-Down PCR. The expression plasmid pET-30a (+)-CPM-rLL-37 was expressed with fusion protein in *E. coli* BL21 (DE3). The expression rate accounted for 20% of total bacterio-protein, then the expressed product was purified by using high positive ion exchange column Macro-Prep High S; The second method: a fragment of carrier protein molecule was designed that contained 28 amino-acid residue and its pHi was 2.7, net charge was -6.0 at pH 7.4. After the expression plasmid pET-30a(+)-CPM-rLL-37 was constructed successively, it was expressed in *E. coli* BL21 Star (DE3). The expressed fusion protein accounted for 35% of total bacterio-protein, then the expressed product was purified by using affinity binding chromatography with TALON resins successfully. The obtained 2 kinds of

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400426);西南医院创新基金资助项目(2002)

Supported by National Nature Science Foundation of China (30400426) and Creative Funds of Southwest Hospital (2002)

作者简介:杨艳丽(1976-),女,四川省绵阳市人,硕士研究生,医师,主要从事蛋白质基因工程方面的研究。电话:(023)68752246, E-mail: a06974723@yahoo.com.cn

通讯作者:葛晓冬,电话:13708362206, E-mail: xiaodongge650@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-09-12;**修回日期**:2006-09-18

rLL-37 were able to kill both Gram-negative and -positive bacteria by the means of inhibitory zone. **Conclusion** It's feasible to prepare efficiently rLL-37 in procaryotic system, which founds the basis for the further research on bactericidal activity of rLL-37.

Key words: human cathelicidin LL-37; expression of fusion protein; carrier protein molecule

LL-37 是 Cathelicidin 家族中唯一存在于人体内的杀菌肽，除了具有抗菌作用外，LL-37 在感染免疫中还具有拮抗内毒素作用，因此 LL-37 在体内的作用受到越来越多的重视[1,2]。根据结构与功能（structure-activity relationship，SAR）研究显示，所有 α-螺旋抗菌肽的抗菌活性和抗菌谱与肽链中所带正电荷、疏水性氨基酸数目密切相关[3,4]。为了提高人源 LL-37 多肽的抗菌活性，本课题组对 LL-37 进行分子改造（$Glu_{16}\rightarrow Gln_{16}$、$Asp_{26}\rightarrow Asn_{26}$、$Glu_{36}\rightarrow Gln_{36}$），提高了 LL-37 的正电荷[5,6]，并采取 2 种方法进行制备。一方面将编码 rLL-37 基因序列放入载体 pET-28a（+）于工程菌 BL21（DE3）中融合表达；另一方面将编码 rLL-37 基因序列中的部分原核细菌稀有密码子替换为原核细菌偏爱密码子，并在其 N 端加入一段编码负电荷、亲水性强的承载蛋白（carrier protein molecule，CPM）基因序列，放入载体 pET-30a（+）于优势工程菌 BL21 Star（DE3）中融合表达，将上述 2 种方法对 rLL-37 多肽的融合表达、纯化和抗菌活性进行对比，以便寻找较好的制备方法，为改良 LL-37 的大量制备及生物学活性研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　主要材料及试剂来源

pMD18-T 载体、Ex *Taq* 酶、*Sac* Ⅰ、*Hind* Ⅲ、Fxa 裂解试剂盒购自 TaKaRa 公司；抗 6×His mAb（1922416）购自 Roche 公司；PCR 引物由上海生工合成；6×His 亲和纯化 TALON（Cat. 8908-2，Clontech）柱芯购自 Clontech 公司；强阳离子交换柱芯 Macro-Prep High S 购自美国 Bio-Rad Laboratories 公司。

1.2　承载分子的设计及两种方法构建 rLL-37 表达质粒的电荷分析

参考文献[7]设计了一个 84 bp 的 DNA 序列，该序列编码 28 个氨基酸组成的承载分子，其 pHi 2.7、pH 7.4 时电荷为 -6.0。将这一段编码带负电荷的承载蛋白基因序列加入 rLL-37 多肽的 N 端。将编码 rLL-37 基因序列中的部分原核细菌稀有密码子替换为原核细菌偏爱密码子（GGA 替换为 GGT、AGA 替换为 CGT）。应用蛋白质分析软件 Anthepro 5.0 对 2 种表达载体 pET-28a（+）、pET-30a（+）及构建的表达质粒 pET-28a（+）-rLL-37、pET-30a（+）-CPM-rLL-37 所编码的融合蛋白进行分析。

1.3　rLL-37 及其融合表达质粒的构建

1.3.1　编码 rLL-37 的 DNA 序列的获得　　N 端引物：5′-AATATCGAAGGTCGCCTGCTGGGAGATTTCTTCAGAAAATCTAAGGAGAAGATCGGAAAGCAGTTCAAGAGAATCGTT-3′（含 *Sac* Ⅰ 酶切位点），C 端引物：5′-TCTATTACTCTGAGTTCTAGGAACCAGATTTCTCAGGAAGTTCTTGATTCTTTGAACGATTCTCTTGAACTGCTT-3′（含 *Hind* Ⅲ 酶切位点）。以 Touch-Down PCR 法进行扩增。PCR 条件为：1 个循环（94 ℃ 2 min）、2 个循环（94 ℃ 40 s、65 ℃ 40 s、72 ℃ 40 s）、1 个循环（72 ℃ 2 min）。

1.3.2　加入承载蛋白分子和密码子替换的 rLL-37 的 DNA 序列的获得　　N 端引物：5′- TTCGAGCTCGAAGTTTGGAACGCACTTGATGCACTGGAGCTGGTAATCCAACAAGAGGAGGGTTCTAATGGTACTTCTACTGGATCCGAGGGCATCGAGGGTCGCCTGCTGGGTGATTTCTTCCGT-3′（含 *Sac* Ⅰ 酶切位点），C 端引物：5′-CGCAAGCTTGCGACCCTCAATGGACTGTGTACGTGGTACAAGGTTGCGCAAAAAGTTCTTGATACGCTGTACAATGCTGTTAAACTGTTTACCAATCTTCTCTTTAGATTTACGGAAGAAATCACCCAGCAG-3′（含 *Hind* Ⅲ 酶切位点），以 Touch-Down PCR 法条件同前进行扩增。

1.3.3　编码 rLL-37 融合表达质粒的构建　　将 rLL-37 和密码子替换 rLL-37 的 DNA 序列分别经 1.7% 凝胶电泳、纯化，以连接试剂盒（DNA ligation Kit Ver 2.0）连接入 pMD18-T 载体（16 ℃ 连接 3 h），转入感受态 DH5α 菌中，行蓝白斑筛选。白色单菌落进行测序，序列正确的单菌落进行扩增、质粒抽提，并进行双酶切（*Sac* Ⅰ 及 *Hind* Ⅲ）、凝胶电泳和纯化。纯化后的目的片段分别与同样处理的载体 pET-28a（+）、pET-30a（+）连接，转入 DH5α 菌中，铺 LB 板（含 Amp 20 mg/ml）进行抗性筛选，阳性菌落进行测序鉴定，正确的单菌落进行扩增、质粒抽提，并将质粒分别电转入表达菌 BL21（DE3）、BL21 Star（DE3）中。

1.4　rLL-37 的表达及纯化

将含有目的质粒的 BL21、BL21 Star（DE3）菌在 $D(600)$ 0.6～0.8 时，以 IPTG 1 mmol/L 诱导表达，寻找最佳表达时间点。分别收集表达菌体，提取其可溶性蛋白质及包涵体，然后以 6×His TALON 柱芯亲和纯化，条件为：5 mmol/L 的咪唑洗涤杂蛋白，然后用 A、B、C 洗脱液（分别含咪唑 150、300、500 mmol/L）行梯度纯化。各个蛋白质洗脱峰分别回收、脱盐、冻干并进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 鉴定。

1.5　rLL-37 杀菌活性的初步研究

参照文献[7,8]的方法，将融合表达的 rLL-37 以 FXa 进行酶切，用 MIC、MBC、抑菌圈试验[3,9]测定 rLL-37 多肽杀菌活性。

1.6　统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

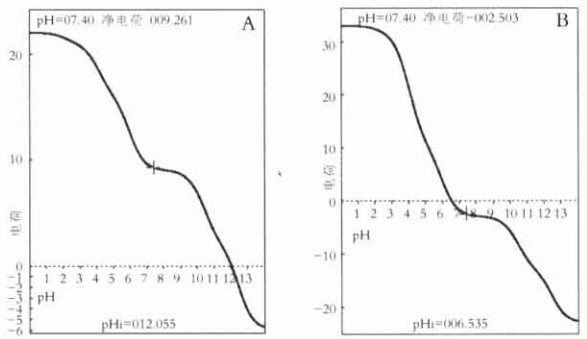
2.1 本实验设计的承载蛋白分子

基因序列(84 bp):GAAGTTTGGAACGCCCTGGACGCCCTTGAGCTGGTAATCCAACAAGAGGAGGGTTCTAATGGCACCTCCACTGGATCCGAGGGC。

2.2 两种方法构建 rLL-37 表达质粒的电荷分析

应用软件 Anthepro 5.0 对 2 种 pET 载体及融合蛋白进行电荷分析,载体 pET-28a(+)上参与表达的多肽的 pHi 8.2,在 pH 7.4 时净电荷为 0.26;载体 pET-30a(+)上参与表达的多肽的 pHi 4.4,在 pH 7.4 时净电荷为-11.73;质粒 pET-28a(+)-rLL-37 所表达的融合蛋白 pHi 12.0,在 pH7.4 时净电荷为 9.2(图 1A)。

将编码 rLL-37 基因序列中的部分原核细菌稀有密码子替换为原核细菌偏爱密码子(GGA 替换为 GGT、AGA 替换为 CGT),同时在 rLL-37 多肽的 N 端加入一段 CPM(pHi 2.7、pH 7.4 时电荷为 -6.0)来制备表达质粒 pET-30a(+)-CPM-rLL-37,其编码的融合蛋白 pHi 6.5,在 pH 7.4 时净电荷为 -2.5(图 1B)。



A:质粒 pET-28a(+)-rLL-37 融合蛋白电荷改变;B:质粒 pET-30a(+)-CPM-rLL-37 融合蛋白电荷改变

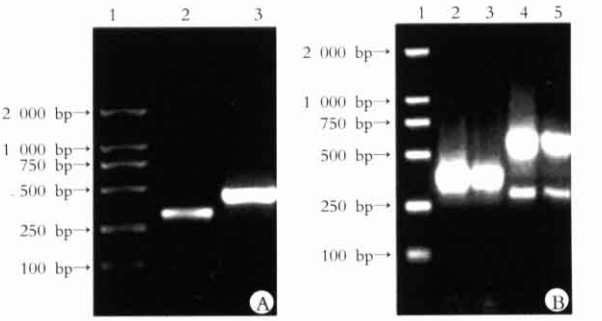
图 1 两种表达质粒的电荷分析

2.3 rLL-37 融合表达质粒的构建

采用 Touch-Down PCR 方法,分别获得了目的 DNA 序列(长约 140、210 bp),将其分别转入 T 载体及表达载体 pET-28a(+)、pET-30a(+)中,制备了表达质粒 pET-28a(+)-rLL-37 和 pET-30a(+)-CPM-rLL-37,经凝胶电泳鉴定其长度约为 5 500、5 600 bp,与设计的含目的片段质粒的长短相近(为 5 488、5 635 bp)。以质粒 pET-28a(+)-rLL-37、pET-30a(+)-CPM-rLL-37 和空质粒 pET-28a(+)、pET-30a(+)为模板,以引物(T7 启动子和 T7 终止子)进行 PCR 扩增,分别获得长为 320、440、370、590 bp 的条带(图 2),与理论值相符,证明两种表达质粒均含有外源目的片段,经 DNA 序列测定证明 DNA 序列正确。

2.4 rLL-37 的表达及纯化

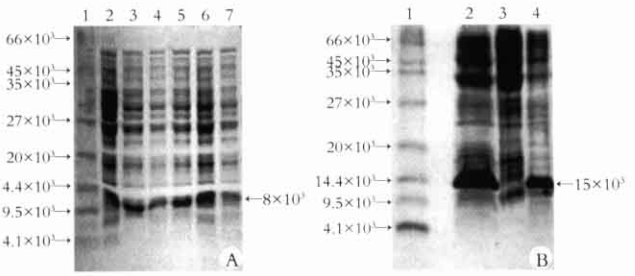
质粒 pET-28a(+)-rLL-37 在 BL21(DE3)中用 IPTG 诱导表达,发现第 9 小时的表达量最高(图 3A),经 SDS-PAGE 电泳见表达出分子质量约为 8×10^3 的融合蛋白(含载体部分片段及 rLL-37 多肽),与预期值相同,用凝胶扫描显示融合蛋白表达量约占全菌蛋白的 20%;质粒 pET-30a(+)-CPM-rLL-37 在 BL21 Star(DE3)中用 IPTG 诱导表达,发现第 8 小时的表达量最高,经 SDS-PAGE 电泳见表达出分子质量约为 15×10^3 的融合蛋白(含载体部分片段、rLL-37 多肽及 CPM),与预期值相同(图 3B),用凝胶扫描显示融合蛋白表达量约占全菌蛋白的 35%。



A:质粒 pET-28a(+)-rLL-37 的 PCR 鉴定　1、4:DNA 标记;2:质粒 pET-28a(+)为模板,T7 启动子和 T7 终止子为引物进行 PCR 扩增;3:质粒 pET-28a(+)-rLL-37 为模板,T7 启动子和 T7 终止子为引物进行 PCR 扩增

B:质粒 pET-30a(+)-CPM-rLL-37 的 PCR 鉴定　1:DNA 标准;2,3:质粒 pET-30(+)为模板,T7 启动子和 T7 终止子为引物进行 PCR 扩增;4,5:质粒 pET-30a(+)-CPM-rLL-37 为模板,T7 启动子和 T7 终止子为引物进行 PCR 扩增

图 2 质粒 pET-28a(+)-rLL-37 和 pET-30a(+)-CPM-rLL-37 的 PCR 鉴定



A:质粒 pET-28a(+)-rLL-37 融合表达的电泳分析　1:蛋白质标记;2:空 BL21 以 IPTG 诱导表达后的全菌蛋白;3-6:含 pET-28a(+)-rLL-37 的 BL21 以 IPTG 诱导表达 3、6、9、12 h 的全菌体蛋白;7:含空质粒 pET-28a(+)的 BL21 菌以 IPTG 诱导表达后的全菌蛋白

B:质粒 pET-30a(+)-CPM-rLL-37 融合表达的电泳分析　1:蛋白质标记;2:含 pET-30a(+)-CPM-rLL-37 的 BL21 star(DE3)菌以 IPTG 诱导表达的包涵体蛋白;3:含 pET-30a(+)-CPM-rLL-37 的 BL21 star(DE3)菌以 IPTG 诱导表达的全菌蛋白;4:含 pET-30a(+)-CPM-rLL-37 的 BL21 star(DE3)菌以 IPTG 诱导表达的可溶性蛋白

图 3 SDS-PAGE 电泳分析

方法 1 表达的融合蛋白经 TALON 柱芯亲合纯化时发现 A 峰幅度较小,用 B、C 洗脱液纯化时未见明确洗脱峰,将 6×His TALON 纯化收集的 A、B、C 峰经脱盐、冻干后用 SDS-PAGE 电泳也未见明确蛋白条带,说明表达的融合目的蛋白质无法被 TALON 柱芯有效纯化。将其换用强阳离子交换柱芯 Macro-

Prep High S 进行梯度纯化，条件为：平衡液 1 × PBS 液（含 NaCl 10 mmol/L pH 8.4），洗脱 A、B、C、D 液分别为含 NaCl 220、350、500、1 000 mmol/L 的 1 × PBS 液，收集到一个较大的 B 峰和较小的 A、C、D 峰，各个峰蛋白质回收经脱盐、冻干后用 SDS-PAGE 电泳见 B 峰有明确蛋白条带，提示表达的融合蛋白质可被强阳离子交换柱芯有效纯化。

方法 2 表达的融合蛋白调 pH 7.0，使其所带电荷接近于零，用 TALON 柱芯纯化，150 mmol/L 的咪唑洗下一个宽大的 B 峰，在 300 mmol/L 的咪唑洗下 1 个较小的 C 峰，经 SDS-PAGE 电泳鉴定 B 峰有明确蛋白条带，说明表达的融合蛋白能成功由 TALON 柱芯纯化。

2.5　rLL-37 的初步杀菌活性检测

经抑菌圈实验证实 2 种构建表达的 rLL-37 多肽对 G^+、G^- 菌都具有很好的杀菌力，无明显差异（$P>0.05$）。测得 rLL-37 对金黄色葡萄球菌（ATCC25923）的抑菌作用优于 Amp；rLL-37 多肽对粪肠球菌（ATCC29212）的 MIC（8 ± 3.5）μg/ml、MBC（32 ± 9.4）μg/ml 与 AMP 对粪肠球菌（ATCC29212）的 MIC（4 ± 2.1）μg/ml、MBC（32 ± 10.5）μg/ml 相近（$P>0.05$）。

3　讨论

具有抗菌活性的杀菌肽在 *E. coli* 中直接表达时面临 2 个难题：一是杀菌肽对原核细胞（如细菌）具有抑杀作用，不易于用原核表达系统直接表达，二是，杀菌肽为小分子，表达产物不稳定，产量不高[7]。本实验成功构建 2 种表达质粒 pET-28a（+）-rLL-37 和 pET-30a（+）-CPM-rLL-37，并在原核系统中融合表达，工程菌 BL21（DE3）、BL21 Star（DE3）都能比较正常生长和表达融合目的蛋白质，证明在融合蛋白质中 rLL-37 的杀菌力受到一定的抑制，对表达宿主菌无严重的直接杀伤作用。

质粒 pET-30a（+）-CPM-rLL-37 于 BL21 Star（DE3）中表达的量明显高于质粒 pET-28a（+）-rLL-37 在 BL21（DE3）中表达的量，分析原因：①表达质粒 pET-30a（+）-CPM -rLL-37 中 rLL-37 基因序列的部分原核细菌稀有密码子，通过基因重合成替换为原核细菌偏爱密码子，有利于融合蛋白在原核系统中表达，从而提高表达水平。②质粒 pET-30a（+）-CPM-rLL-37 中 rLL-37 基因序列的 N 端加入了一段编码带负电荷的 CPM 基因序列，使得融合蛋白的净电荷降低，也降低 rLL-37 多肽对表达宿主菌的损害；同时加入 CPM，rLL-37 多肽分子质量由 8×10^3 增加到 15×10^3，从而提高了表达产物的稳定性和表达产量。③将质粒 pET-30a（+）-CPM-rLL-37 的表达宿主菌用 BL21 Star（DE3），其优势在于 BL21 Star（DE3）缺少 RNA 核酸内切酶（RnaseE），因此使得表达目的蛋白的 mRNA 序列降解较慢，维持细菌内 mRNA 较高水平，从而有利于目的蛋白的翻译和表达。④载体 pET-30a（+）上参与表达的多肽 pHi 4.4，pH 7.4 时净电荷为 -11.73，使得质粒 pET-30a（+）-CPM-rLL-37 所编码的融合蛋白净电荷降低，从而进一步降低 rLL-37 多肽对表达宿主菌的损害，提高表达产物稳定性和表达产量。

方法 1 表达的融合 rLL-37 多肽，其 N 端带有载体 pET-28a（+）所编码的 6 × His，因此我们曾尝试以针对 6 × His 的 TALON 柱芯对融合蛋白进行纯化，但实验中发现融合目的蛋白不与柱芯结合，分析原因可能是融合多肽在 pH7.4 时仍带有约 9.2 的阳电荷，因此融合蛋白与 TALON 柱芯上的 CO^{2+} 相排斥，影响了融合多肽中的 6 × His 肽序列与 CO^{2+} 结合，从而无法有效纯化。我们将其换用强阳离子交换柱芯 Macro-Prep High S 进行梯度纯化效果较好，但纯度稍差。方法 2 表达的融合多肽可被 TALON 柱芯进行有效纯化，并且纯度较高，为进一步大量制备 rLL-37 多肽并详细研究其生物学功能奠定了基础，也为临床抗菌治疗探索提供新的有效途径。

参考文献：

[1] ZANETTI M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity[J]. Leukoc Biol 2004, 75(1): 39 - 48.

[2] SCOTT M G, DAVIDSON D J, GOLD M R, *et al*. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses[J]. J Immunol, 2002, 169(7): 3883.

[3] NAGAOKA I, HIROTA S, NIYONSABA F, *et al*. Augmentation of the lipopolysaccharide-neutralizing activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by replacement with hydrophobic and cationic amino acid residues[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(5): 972 - 982.

[4] NAGAOKA I, KUWAHARA-ARAI K, TAMURA H, *et al*. Augmentation of the bactericidal activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by amino acid substitutions[J]. Inflamm Res, 2005, 54(2): 66 - 73.

[5] 葛晓冬，刘友生，杨艳丽，等. 人源 LL-37 杀菌多肽的改建及其在原核细胞的表达[J]. 第三军医大学学报, 2005, 28(7): 636 - 639.

[6] NELL M, TJABRINGA G, WAFELMAN A, *et al*. Development of novel LL-37 derived antimicrobial peptides with LPS and LTA neutralizing and antimicrobial activities for therapeutic application [J]. Peptides, 2005, 27(4): 649 - 660.

[7] 饶贤才，金晓琳，胡晓梅，等. 一个承载分子的设计与肽抗生素 hPAB-β 的高效表达[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(4): 389 - 392.

[8] 袁榴娣，窦　非，梁玉璞，等. 含有 FXa 切割位点的抗菌肽 X 在大肠杆菌中的融合表达[J]. 生物工程学报, 2000, 16(3): 411 - 413.

[9] ZHAO C, NGUYEN T, BOO L M, *et al*. RL-37, an alpha-helical antimicrobial peptide of the rhesus monkey[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(10): 2695 - 2702.

（编辑　汪勤俭）