文章编号:1000-5404(2009)10-0883-04

论著

重组人β防御素4的原核表达、纯化及抗铜绿假单胞菌活性初探

甘晓琴,伍素华,罗向东,杨 成,吴 燕 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 制备原核表达的重组人β防御素4(human beta defensin 4,HBD4),初步探讨其对铜绿假单胞菌的体外抗菌活性。**方法** 将编码HBD4的DNA片段连接到大肠杆菌表达载体pET42a中,构建好的表达质粒pET42a-HBD4转化到表达菌株BL21(DE3)中,0.5 mmol/L IPTG诱导表达4 h,亲和纯化融合蛋白后经Western blot鉴定,再以肠激酶酶切融合蛋白,镍柱亲和层析分离HBD4;采用打孔法初测其抗铜绿假单胞菌活性,并用微量稀释法测定HBD4与3种抗生素的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC),比较其抗铜绿假单胞菌活性差异。**结果** GST-HBD4在大肠杆菌中以可溶形式成功表达,纯化的重组HBD4体外对铜绿假单胞菌有抗菌活性,其效能略低于亚胺培南,而高于哌拉西林和环丙沙星。**结论** 采用基因工程技术成功表达了重组HBD4,其对铜绿假单胞菌有较强的杀菌活性,具有烧伤创面感染治疗的应用前景。

关键词: 抗菌肽;人β防御素4;亲和纯化;铜绿假单胞菌
中图法分类号: R378.991;R394-33;R977.6 **文献标识码:** A

Prokaryotic expression and purification of human beta defensin 4 and its bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa*

GAN Xiao-qin, WU Su-hua, LUO Xiang-dong, YANG Cheng, WU Yan (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore a new approach to express bioactive human beta defensin 4 (HBD4) in *E. coli*. Methods The gene fragment of HBD4 was artificially synthesized according to the sequence in GenBank and then cloned into the pET42a vector. The recombinant pET42a-HBD4 was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) after verification by endonuclease restriction and sequencing analysis. The expression was induced by 0.5 mmol/L IPTG for 4 h, and the fusion protein was purified by Ni-resin chromatography and identified by Western blotting. The recombinant GST-HBD4 was digested by enterokinase and purified by Ni-resin chromatography again. Furthermore, the bactericidal activities of HBD4 against *Pseudomonas aeruginosa* were assayed *in vitro*. The minimal inhibitory concentrations (MIC) and the minimal bactericidal concentrations (MBC) of HBD4 against the bacterium were compared with Imipenem, Piperacillin or Ciprofloxacin. Results The GST-HBD4 fusion protein was expressed as a soluble protein in *E. coli* BL21 (DE3) successfully, and the purified HBD4 displayed antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. Meanwhile, the antibacterial activities of HBD4 was superior to Piperacillin and Ciprofloxacin, but inferior to Imipenem. Conclusion The bioactive peptide of HBD4 is successfully expressed, and exhibits strong activity against *Pseudomonas aeruginosa*, which has the possibility for control of the burn would infection.

Key words: antibacterial peptide human Beta defensin 4; affinity purification; *Pseudomonas aeruginosa*

人防御素是机体抵抗病原微生物入侵的第1道天然防线,是人体内重要的天然免疫物质。人防御素含40~50个氨基酸,是相对分子质量为(4~5)×10^3的阳离子短肽。分子内含有6个保守的半胱氨酸残基,可形成3个典型的分子内二硫键,构成3个稳定的反向β片层结构;是一类具有广谱抗微生物活性的小分

基金项目:国家自然科学基金(30730093)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30730093)
作者简介:甘晓琴,女,重庆市人,硕士研究生,主管护师,主要从事医院感染方面的研究,发表论文6篇。E-mail: qcq333@sina.com
通信作者:伍素华,电话:(023)68754097
罗向东,E-mail: luoxd@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2008-11-24;修回日期:2009-03-05

子抗菌肽，具有抗菌、抗病毒及杀伤肿瘤细胞的多种效应，其作用机制独特，效能强大，至今尚未发现对其产生耐药性的病菌，因此被认为能够成为替代抗生素的首选药物，而且当前已有一些防御素开发成药进入临床试验[1-3]。

人β防御素4（human beta defensin 4，HBD4）是属于β防御素，含有50个氨基酸，具有广谱抗菌活性，尤其对耐药性铜绿假单胞菌具有强大的杀菌作用[4]。HBD4天然产量非常低，而化学合成成本比较高，这也成为开发成药的一个瓶颈，所以通过基因工程技术生产防御素具有广阔的应用前景。

大肠杆菌表达系统是目前最为成功的外源蛋白表达系统之一，已有好多阳离子肽在大肠杆菌中成功表达。由于HBD4对大肠杆菌有很强毒性，在大肠杆菌内不能直接表达，因此，我们通过融合谷胱甘肽S转移酶（GST）标签蛋白，在大肠杆菌内表达GST-HBD4融合蛋白，再用肠激酶切割融合蛋白，镍柱纯化得到HBD4多肽，旨在为烧伤创面铜绿假单胞菌的感染治疗寻求一种新的抗菌药。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒的表达宿主菌为 *E. coli* BL 21（DE3），铜绿假单胞菌（ATCC27853）均为本实验室保存，临床分离株分离自本院烧伤细菌培养室，表达载体为pET42a购自Novagen公司。限制性内切酶、*Taq*酶、T_4 DNA连接酶均购自TaKaRa Biotech有限公司，镍柱购自QIAGEN公司，其余常用试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 重组表达载体的构建 参照GenBank HBD4基因序列（AY377581），人工合成HBD4基因，并设计2条引物来添加EK序列于N端及 *Kpn* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ酶切位点。HBD4上游：5′-CACAAGGTACCGACGACGACGACAAGGAATTTGAGCTGGACCG-3′，下游：5′-CACAAAAGCTTTCATTATGGTTTCGTGCGATTCAG-C-3′，长度为193 bp。反应条件：94 ℃预变性3 min，然后94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 15 s共30个循环；最后72 ℃ 5 min。PCR产物和pET42a均用 *Kpn* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ进行双酶切，T_4 DNA Ligase连接，并将连接产物转化DH5α；对重组表达载体进行PCR、双酶切检测及测序分析，筛选构建正确的重组表达载体并将其命名为pET42a-HBD4。

1.2.2 重组表达载体的表达及分析 将表达载体转化入宿主菌 *E. coli* BL 21（DE3），挑取含重组表达质粒的单菌落于3 ml LB中，37 ℃过夜培养；次日以1%接种量接种到3 ml新鲜LB培养基中，37 ℃继续培养至 $D(600)$ 为0.6，加入IPTG至终浓度为0.5 mmol/L，37 ℃诱导表达4 h，SDS-PAGE分析其表达情况。

1.2.3 重组融合蛋白纯化及Western blot鉴定 将含重组表达质粒的表达菌按最佳条件放大诱导表达后，5 000 r/min离心收集菌体，菌体重悬于缓冲液A（20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0，0.5 mol/L NaCl，10 mmol/L咪唑）4 ℃，超声破碎细胞（4 s工作，8 s间隙，100次），12 000 r/min离心10 min，收集上清，将上清上样到缓冲液A平衡好的Ni-NTA柱上，用过量的缓冲液A洗去非特异性结合的杂蛋白，然后用5倍柱体积的缓冲液B（20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0，0.5 mol/L NaCl，250 mmol/L咪唑）洗脱目的蛋白；收集各部分进行电泳检测分析，将收集到的目的融合蛋白于20 mmol/L Tris（pH 8.0）溶液透析，去除咪唑及其他盐，以备融合蛋白酶切。

融合蛋白经12% SDS-PAGE电泳后，半干法（1 mA/cm^2，60 min）电转移至NC膜，5%脱脂奶粉封闭，加入抗His标签单克隆抗体（1∶2 000稀释），4 ℃过夜，1‰ TBST洗膜，加入HRP标记羊抗鼠IgG（1∶2 000稀释），室温下孵育1 h，1‰ TBST洗膜，化学发光试剂检测。

1.2.4 肠激酶酶切融合蛋白及纯化 50 μl酶切反应体系如下：20 μg GST-HBD4融合蛋白与1 U肠激酶于酶切缓冲液中（20 mmol/L Tris-HCl，50 mmol/L NaCl，2 mmol/L $CaCl_2$，pH 7.4），室温孵育12 h，Tricine SDS-PAGE[5]检测酶切效果；由于未完全切割的融合蛋白、切割下来的GST蛋白标签及肠激酶都含有6个组氨酸，均可吸附于镍柱上；而酶切下来的HBD4多肽不含有6个组氨酸，不能与镍柱结合，故可把酶切后的混合液上样于缓冲液A平衡好的镍柱，收集流出液，即HBD4多肽。将纯化后的HBD4多肽冻干浓缩后，过滤除菌分装保存于-80 ℃。

1.2.5 HBD4对铜绿假单胞菌的体外抗菌活性研究 用琼脂糖扩散法进行打孔测活实验[6]，具体如下：取10 μl活化的铜绿假单胞菌和10 ml 50 ℃左右的1.5%琼脂糖LB充分混合倒平板。用灭菌过的枪头打孔，直径约为0.4 cm，然后在孔中加入待测样品液，以无菌水作为阴性对照，置于37 ℃培养过夜。

在96孔培养板（COSTAR）中，采用微量稀释法[7]测定HBD4和亚胺培南、哌拉西林、环丙沙星对铜绿假单胞菌标准菌株（ATCC27853）及临床分离菌株的最小抑菌浓度（MIC）和最小杀菌浓度（MBC），比较其体外抗菌活性。

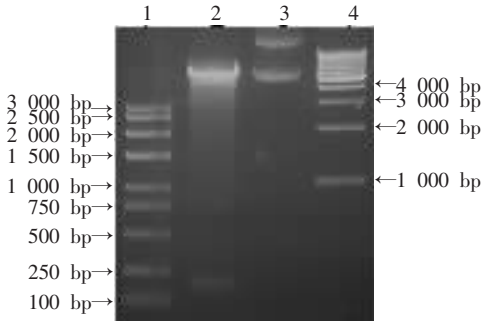
MIC的判定：测试孔 $D(490)$ 值与空白对照孔 $D(490)$ 值有显著差异的最低抗生素浓度为抗生素对该测试菌的MIC。

MBC的测定：取MIC浓度孔以上未见浑浊的高浓度抗生素的第2孔，吸出培养液，分别用灭菌后的玻棒，在超净台下均匀涂布MH琼脂平板，37 ℃培养16～18 h，对平板菌落计数。计数小于5 CFU/平板的培养液孔的浓度即为抗生素对该测试菌的MBC[8]。

2 结果

2.1 重组质粒构建

重组质粒经双酶切后，在100～250 bp之间有1条带，经测序证实结果正确，表明原核表达载体构建成功，见图1。

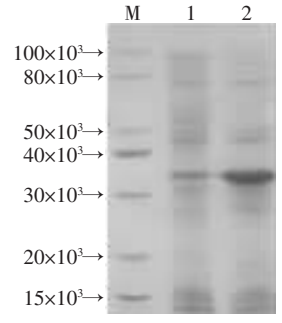


1: DNA 标准(DL 3000); 2: 重组质粒 pET42a-HBD4 经 *Kpn* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切; 3: 重组质粒 pET42a-HBD4; 4: DNA 标准(1 kb ladder)

图 1　重组质粒双酶切鉴定电泳结果

2.2　重组 pET42a-HBD4 的表达

将构建正确的重组表达质粒 pET42a-HBD4 转化表达宿主菌,宿主菌在 37 ℃,0.5 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后,SDS-PAGE 分析(图 2),在 35×10^3 位置处有明显的蛋白质条带,与预期的融合蛋白相对分子质量一致,说明 GST-HBD4 融合蛋白在大肠杆菌中成功表达。凝胶扫描分析表明,融合蛋白的表达量约占菌总蛋白的 20%。37 ℃,0.5 mmol/L IPTG 的诱导条件下,融合蛋白大多数以可溶的形式表达,在后面的纯化实验中,我们以该条件进行放大诱导表达。

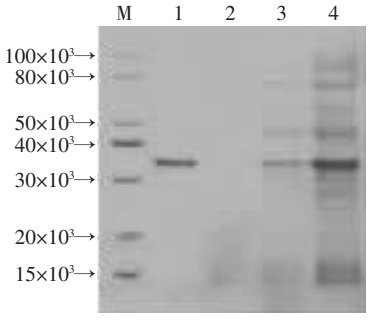


M:蛋白相对分子质量标准; 1:未诱导; 2:IPTG 诱导

图 2　GST 融合蛋白表达分析

2.3　GST-HBD4 的纯化

诱导表达后的菌体离心收集,超声破碎,离心收集上清液进行纯化,用镍柱亲和层析方法纯化可溶的融合蛋白,镍柱纯化后融合蛋白的纯度达到 95% 以上,结果见图 3。

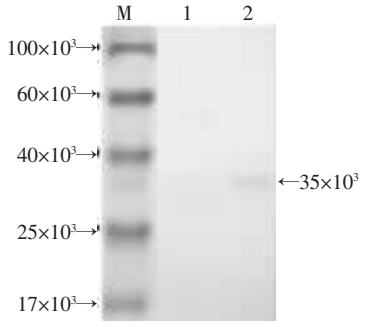


M:蛋白相对分子质量标准; 1:目的融合蛋白;2:洗涤液;3:流出液;4:超声破碎离心后的上清蛋白

图 3　融合蛋白纯化 SDS-PAGE 分析

2.4　重组蛋白免疫印迹鉴定

Western blot 分析显示,纯化的重组融合蛋白与抗 His 标签单克隆抗体反应,在相对分子质量约 35×10^3 处出现特异的蛋白条带,与预测基本一致;而大肠杆菌 BL21(DE3)菌体裂解物无此反应,说明所纯化的融合有 6×His 标签的目的蛋白是正确的,结果见图 4。

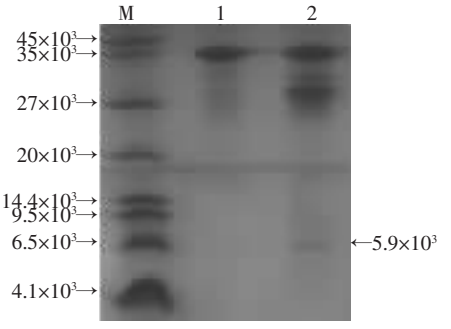


M:预染蛋白相对分子质量标准; 1: 阴性对照; 2: 目的融合蛋白

图 4　融合蛋白 Western blot 检测结果

2.5　HBD4 纯化

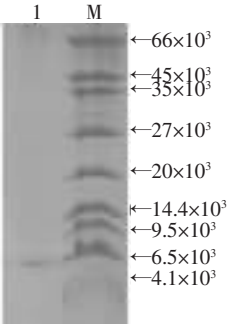
HBD4 相对分子质量只有 5.9×10^3,在常规 SDS-PAGE 系统中难以得到理想的分辨率,我们使用 Tricine SDS-PAGE(16% 分离胶,10% 中间胶, 4% 浓缩胶)来检测 EK 酶切效果,Tricine SDS-PAGE 结果显示:融合蛋白经 EK 酶切后,在 5.9×10^3 处出现 1 条特异带(图 5)。



M:蛋白相对分子质量标准; 1: GST-HBD4 融合蛋白; 2: GST-HBD4 酶切后混合液

图 5　融合蛋白 EK 酶切电泳结果

GST-HBD4 融合蛋白经 EK 酶切后,将酶切混合物再次上镍柱进行纯化,收集流出液即 HBD4 多肽,冻干浓缩后,Tricine 电泳检测,其纯度达到 85% 以上(图 6)。

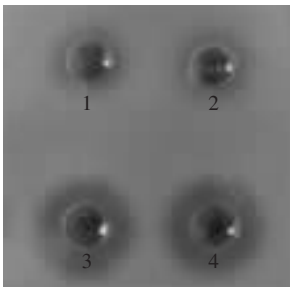


1: 2 μg HBD4 多肽; M:蛋白相对分子质量标准

图 6　HBD4 纯化电泳结果

2.6 HBD4 对铜绿假单胞菌体外抗菌活性的测定

测活结果显示,在加样孔周围有透明的抑菌圈,而阴性对照则没有,说明重组 HBD4 对铜绿假单胞菌有较强的抗菌活性(图 7)。



1:无菌水; 2: GST-HBD4 融合蛋白; 3:纯化的 HBD4; 4:阳性对照(抗生素)

图 7 抑铜绿假单胞菌活性实验

由表 1 可见,无论是对铜绿假单胞菌的标准菌株,还是对临床分离株,HBD4 的 MIC 和 MBC 都是小于哌拉西林和环丙沙星而大于亚胺培南,提示其较前 2 种传统抗生素对铜绿假单胞菌在体外具有更好的杀菌活性。

表 1 HBD4 与 3 种抗生素对铜绿假单胞菌体外抗菌活性比较 (μg/ml)

抗生素	铜绿假单胞菌		临床分离株	
	MIC	MBC	MIC	MBC
哌拉西林	31.3(0.072)	125.0(0.290)	500.0(1.160)	1 000.0(2.318)
亚胺培南	<1.9(0.001)	1.9(0.001)	<1.9(0.001)	3.8(0.002)
环丙沙星	31.2(0.071)	62.5(0.145)	>1 000.0(2.265)	>1 000.0(2.265)
HBD4	125.0(0.028)	250.0(0.056)	150.0(0.033)	300.0(0.067)

括号内为物质的量浓度,单位为 mmol/L

3 讨论

烧伤创面感染的耐药菌株愈来愈多,常规抗生素的局限性也日益明显,尤其是因感染而造成的烧伤患者死亡率一直居高不下,因此寻找新的抗菌资源已成为备受关注的焦点[9]。近年来研究表明,防御素具有广谱、高效的抗菌活性,因而随着细菌对广谱抗生素的耐药性增加,有望成为新型的抗生素。HBD4 是一种重要的人体防御素,具有抑制 G^+、G^- 菌的活性,同时对一些酵母也有很强的抑菌活性,特别是对铜绿假单胞菌的杀伤作用是其他防御素的 6 倍,且与其他抗生素及溶菌酶具有协同作用[2]。因此 HBD4 有望成为较好的烧伤创面用药,具有广阔的研究和临床应用前景。

天然的 HBD4 含量很低,天然提取纯化难度大,而人工合成成本又比较高,因此,获得大量的 HBD4 是其被广泛应用的瓶颈。采用重组表达的方法可大量获得 HBD4,以满足其抗菌机制研究及开发成新型药物的需求,但由于 HBD4 具有抗菌活性,同时相对分子质量比较小,在细菌体内容易被降解,因而不宜用于原核直接表达。融合标签蛋白进行原核表达或在真核载体表达是目前 2 种解决方法。本研究通过融合蛋白表达的方式将 HBD4 基因克隆到 pET42a 中,利用载体上的 GST 蛋白和 T_7 启动子实现了 GST-HBD4 融合蛋白的可溶性表达,易于纯化目的蛋白;此外,由于肠激酶切割的特点,采用肠激酶特异性的切除 GST 标签蛋白后可获得具有天然氨基酸序列的 HBD4。

人防御素的杀菌机制不同于传统抗生素,它具有非特异性的广谱杀菌作用。其次抗生素不管采用哪种机制,作用于细菌,都是依赖药物分子与药物靶点之间的相互作用,而后对细菌生长产生抑制效应。因而影响抗生素活性的一个非常重要的因素就是抗生素作用于细菌的分子数,所以在本实验中,我们采用物质的量浓度来定义它们抑菌活性的强弱,这样就保证了衡量抗菌效能发挥的相对可比性。

本研究采用 GST 标签融合目的蛋白的原核表达系统成功地地表达了可溶性的 GST-HBD4 融合蛋白,并纯化得到了具有生物学活性的 HBD4。我们对铜绿假单胞菌的体外抗菌活性测定也表明。该融合蛋白对烧伤创面感染的常见致病菌铜绿假单胞菌显示有较强的体外抗菌活性,提示其对烧伤创面的感染治疗具有潜在的应用前景。

参考文献:

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

[2] Sela B. Defensins: peptides of innate immunity serving as first-line antimicrobial defense[J]. Harefuah, 2000, 139(3 - 4): 112 - 116.

[3] Maisetta G, Batoni G, Esin S, *et al*. *In vitro* bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(2): 806 - 809.

[4] Garcia J R, Krause A, Schulz S, *et al*. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity[J]. FASEB J, 2001, 15 (10): 1819 - 1821.

[5] Schagger H, von-Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa[J]. Anal Biochem, 1987, 166(2): 368 - 379.

[6] Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, *et al*. Insect Immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from Cecropia pupae[J]. Eur J Biochem, 1982, 127(1): 207 - 217.

[7] 应春妹, 汪雅萍, 沈 薇, 等. 微量稀释法检测酵母菌最低抑菌浓度[J]. 上海第二医科大学学报, 2003, 23(2): 174 - 175.

[8] Lancini G, Parenti F, Gallo G G. 抗生素: 多学科研究入门[M]. 王以光, 译. 北京:人民卫生出版社, 1998:18.

[9] 陈郑礼, 袁克俭. 烧伤感染中的抗生素应用进展[J]. 外科理论与实践, 2008, 13(1): 85 - 87.

(编辑 王 红)