基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1643-03

抗菌肽 PR-39 真核表达载体的构建及表达检测

朱勇军[1],翁 玄[1],张 健[1],文阳安[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016;2. 重庆医科大学医学检验生物化学教研室,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建富含脯氨酸精氨酸的 39 位氨基酸抗菌肽(Proline-arginine rich 39-amino acid peptide,PR-39)的真核表达载体,并检测它在 293 T 细胞中的表达情况。方法:以含有 PR-39 核心编码区(Core coding regions, CDS)序列的质粒 pBluescript Ⅱ SK-PR-39 为模板,PCR 扩增 PR-39 CDS 序列并测序。扩增片段插入真核表达质粒 pGC-FU 中,构建包含 PR-39 基因的重组表达质粒 pGC-FU-PR-39。阳性克隆用限制性内切酶酶切及测序鉴定后用脂质体 2 000 转染 293 T 细胞,荧光显像观察其转染效率,Western blot 检测目的蛋白表达情况。结果:成功扩增出 PR-39 基因,通过酶切测序鉴定证明成功构建了包含 PR-39 的真核表达载体 pGC-FU-PR-39,转化 293 T 细胞 24 h 后观察到荧光,Western blot 检测到目的蛋白。结论:本实验成功构建 PR-39 真核表达载体,并能在 293 T 细胞中表达 PR-39-GFP 融合蛋白,这为进一步研究 PR-39 的作用奠定了基础。

【关键词】抗菌肽;PR-39;真核表达载体

【中国图书分类法分类号】R392.11;R394.33;R978.16 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-02-18

Construction of eukaryotic expression vector encoding antimicrobial peptides PR-39 and its expression in 293T cell

ZHU Yong-jun, et al

(*Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct eukaryotic plasmid expressing PR-39 and test whether the plasmid can be expressed in the 293 T cell. *Methods*: The core coding regions (CDS) sequence of PR-39 was amplified by PCR from pBluescript Ⅱ SK-PR-39. Then the PR-39 gene was inserted into the eukaryotic expression plasmid pGC-FU. The resultant recombinant plasmid was confirmed by restriction enzyme cutting and sequencing, and then was designated as pGC-FU-PR-39. The recombinant plasmid pGC-FU-PR-39 was transfected into 293 T cell by Lipofectamine 2000. Transfected efficiency was observed by fluorographic unit. Western blot was used to certify whether the purpose protein was correctly expressed in 293 T cell. *Results*: The CDS sequence of PR-39 was correctly amplified. The recombinant plasmid was successfully constructed and could be correctly expressed in 293 T cell. *Conclusion*: We successfully constructed PR-39 eukaryotic expression plasmid and observed the expression of PR-39-GFP fusion protein. It lays a foundation for further studies of PR-39.

【Key words】Antimicrobial peptide; PR-39; Eukaryotic expression

抗菌肽是生物体分泌的有抗菌活性的小分子肽类物质的总称,具有广谱高效的抗菌作用,并且不易产生耐药菌性[1],是一种新型高效的抗菌新药。富含脯氨酸精氨酸的 39 位氨基酸抗菌肽(Proline-arginine rich 39-amino acid peptide,PR-39)是众多抗菌肽中的一种富含精氨酸的抗菌肽,由猪的小肠上皮细胞分泌。它除了有一般抗菌肽的以上功能外还有抗炎、中和内毒素、促进伤口愈合、诱导血管再生等功能[2-4],有极大的开发和应用价值。本实验通过构建 PR-39 真核表达载体并转染 293 T 细胞为以后基因工程合成抗菌肽 PR-39 以及 PR-39 的生物活性的研究做准备。

作者介绍:朱勇军(1980-),男,硕士,
研究方向:人工关节。

通讯作者:张 健,男,教授,E-mail:68733235@sohu.com。

基金项目:重庆市科委自然科学基金(编号:2008BB5213)。

1 材料与方法

1.1 主要的试剂

基因克隆 pBluescript Ⅱ SK-PR-39 由 Daniela C.Tirziu (USA, Dartmouth medical school) 馈赠,pGC-FU 载体购置于 Genechem 公司,大肠杆菌 DH5α、293 T 细胞由上海吉凯保存,*Age* Ⅰ酶购置于 NEB 公司,DNA 聚合酶等购至 Takara 公司,Lipofectamine2000 购置于 Invitrogen 公司,质粒抽提试剂盒购置于 Qiagen 公司,dNTP 购置于 Promega 公司,DNA ladder Marker 购置于 Fermentas 公司,PCR 引物由上海吉凯基因

技术有限公司合成，一抗（小鼠抗 GFP 抗体）和二抗（山羊抗小鼠 IgG）购置于 Santa-Cruz 公司。

1.2 实验步骤

1.2.1 目的基因的获取 设计和目标质粒 pBluescript Ⅱ SK-PR-39 多克隆位点相匹配的上下游引物，其中加入交换配对碱基（下划线部分）、*Age* Ⅰ 酶切位点（黑体部分）以及表达增强序列（框住部分），并含有目的基因 5' 和 3' 端部分序列（斜体部分），用于 PCR 克隆目的基因。上游引物 5'-CAGGATCCCCGGGTACCGGTCGCCACCATGGAGACCCAGAGGGC-3'；下游引物 5'-TCACCATGGTGGCGACCGGTACC-CGTTTTCCGGGGAACC-3'。以 pBluescript Ⅱ SK-PR-39 为模板 PCR。反应体系如下：上游引物 0.4 μl，下游引物 0.4 μl，去离子水 14.7 μl，10 × buffer 2 μl，$MgCl_2$ 20.5 μl，dNTPs（2.5 mmol）0.8 μl，DNA 聚合酶 0.2 μl，模板（10 ng/μl）1 μl。反应条件：94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，30 个循环，72℃延伸 10 min。产物用 1.8%琼脂糖凝胶电泳分离，并测序。

1.2.2 重组克隆的制备 质粒 pGC-FU 用 *Age* Ⅰ 酶切线性化，与目的基因扩增产物连接，转化感受态 DH5α 细胞，150 μl 已转化的感受态细胞转移到含 20 mmol/L $MgSO_4$ 和 AMP 抗性（100 μg/ml）的 LB 琼脂培养基上于 37℃培养，16 h 长出阳性克隆进行后续 PCR 鉴定。

1.2.3 重组的阳性克隆 PCR 鉴定 以目的基因为模板，用 primer premier 5 软件设计上下游引物。上游序列 5'-GTGCTTCGTGCTGTGGATC-3'；下游序列 5'-CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG-3'，交上海吉凯基因技术有限公司合成。随机挑选出 8 个阳性克隆进行 PCR 反应，反应体系同上。反应条件：94℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 30 s，30 个循环，72℃延伸 6 min。产物用 1.8%琼脂糖凝胶电泳分离，并测序。

1.2.4 pGC-FU-PR-39 转染 293 T 细胞及表达检测 pGC-FU-PR-39 转染 293 T 细胞（按 Lipofectamine2000 说明书操作），24 h 后荧光显微镜显像观察转染效率及 PR-39-EGFP 融合蛋白的表达情况。收集转染成功的细胞，加入 Ep 管中，冰上裂解 10 ~ 15 min，超声仪破碎细胞（200 W 共 4 次，每次 5 s，间隔 2 s），4℃，12 000 g，离心 15 min，取上清，测蛋白浓度后，每个样品蛋白终浓度均调整为 2 μg/μl，-80℃ 保存以备 Western blot 用。另外收集未转染的 293 T 细胞总蛋白作为阴性对照。收集转染空载体 pGC-FU 的 293 T 细胞的总蛋白作为系统参照。15% SDS 聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）电泳分离待测样品，分离的蛋白转到 PVDF 膜上，5%脱脂奶（TBST 配制）室温封闭 1 h，PBS 洗膜；加入一抗小鼠抗 GFP 抗体（Mouse anti-GFP）室温孵育 2 h，TBST 洗膜 3 次每次 10 min；加二抗山羊抗小鼠 IgG（Anti-Mouse）室温孵育 2 h，TBST 洗膜 3 次每次 10 min；采用 ECL+plusTM Western blotting system 试剂盒（Amersham 公司）显色（按试剂盒说明书操作）；X 光显影获得显示条带的胶片。

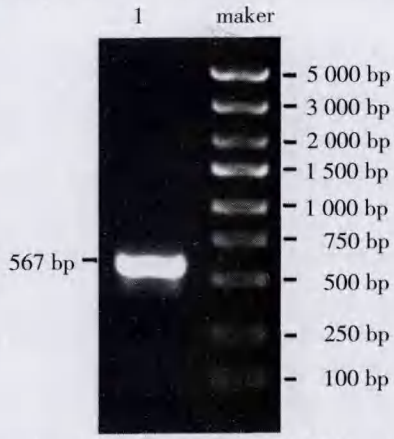
2 结 果

2.1 目的基因扩增结果

以 pBluescript Ⅱ SK-PR-39 为模板的 PCR 扩增产物凝胶电泳后在 567 bp 处见明显的扩增条带（图 1）。并测序，测序结果用 DNAssist Version1.0 软件把它与 GenBank 中 PR-39 基因序列（登录号：L 23825）相比较部分一直。

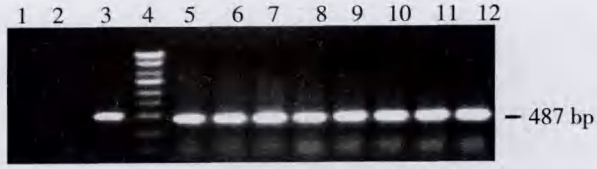
2.2 阳性克隆鉴定结果

阳性克隆 PCR 后在 487 bp 处可见到明显的扩增条带与有确定插入片段的载体组（阳性对照组）扩增产物一样，而空载体组没有扩增出条带（图 2），送经纬公司测序，结果与原模板序列相吻合，说明重组质粒 pGC-FU-PR-39 构建成功。



1. pBluescript Ⅱ SK-PR-39 扩增产物；maker. DNA 分子量标准

图 1 目的基因扩增产物



1. 阴性对照（ddH_2O）；2. 阴性对照（空载体自连对照组）；3. 阳性对照（有确定插入片段的载体组）；4. DNA 分子量标准；5 ~ 12. pGC-FU-PR-39 扩增产物

图 2 重组真核表达载体 pGC-FU-PR-39 PCR 鉴定

2.3 真核表达载体 pGC-FU-PR-39 转染 293 T 细胞后荧光显像

因为质粒 pGC-FU 含有 EGFP 标记基因，所以构建的 PR-39 重组质粒 pGC-FU-PR-39 转染 293 T 细胞后可以通过荧光显微镜观察其转染效率。其转染效率约 20%（图 3）。

2.4 目的基因表达蛋白 Western blot 结果

质粒 pGC-FU 含有 EGFP 编码基因，用鼠抗 GFP 抗体对转染 pGC-FU 的 293 T 细胞样品 Western Blot 检测后在 28 kD 处出现一条特异条带（图 4，1 道），而未转染的 293 T 细胞没有特异条带（图 4，2 道），同时转染 pGC-FU-PR-39 的细胞可以观察到 35 ~ 49 kD 之间有一条特征条带（图 4，3 道），其大小和 PR-39-EGFP 融合蛋白（18 kD+28 kD = 46 kD）相吻合。说明重组表达质粒 pGC-FU-PR-39 可以在真核细胞 293 T 细胞中有效表达目的蛋白。

3 讨 论

随着抗生素耐药菌株的不断产生，人们对传统的抗生素



A. 明视野 × 400

B. 荧光视野 × 400，见部分细胞在荧光显微镜下发出绿色荧光如图中白箭头所示

图 3 pGC-FU-PR-39 转染 293 T 细胞 24 h 后荧光显像



1. 转染 pGC-FU 的 293 T 细胞；2. 未转染的 293 T 细胞；3. 转染 pGC-FU-PR-39 的 293 T 细胞

图 4 目的基因表达的 Western blot 检测

逐渐在失去信心，希望找到一种新的抗菌物质。众多实验研究已经发现 PR-39 对革兰氏阳性、阴性菌、真菌以及结核分枝杆菌等有效[5-7]，特别是对革兰氏阴性菌。其作用机理主要依靠精氨酸残基的正电荷与细菌细胞磷脂膜之间静电引力作用后吸附在细胞膜上并穿透细菌细胞膜进入细胞抑制其 DNA 和蛋白质的合成[8]。因为细菌等原核生物的细胞壁胆固醇含量低而肿瘤等细胞的细胞膜骨架结构不完整，所以 PR-39 能够特异的作用于细菌、肿瘤等细胞而对自身细胞无害[9]。同时它可以趋化中性粒细胞的聚集进一步增加抗菌作用[10]。PR-39 能够抑制巨噬细胞内 NADPH 氧化酶的活性，从而减少氧自由基的产生，以此降低创伤、炎症、缺血等对机体的损伤。PR-39 对巨嗜细胞 NADPH 氧化酶活性的抑制作用源于 PR-39 通过 SH3 结构域与细胞质内 NADPH 氧化酶亚基 p47phox 的结合，此结合导致了此亚基不能与位于细胞膜的 NADPH 氧化酶的另一组分 p22phox 作用，从而阻断了 NADPH 氧化酶的组装[11]。PR-39 能够诱导间充质细胞表达粘连蛋白聚糖 -1 和粘连蛋白聚糖 -2，粘连蛋白聚糖家族除了能够调节细胞粘附外还能够参与血液凝固的调节以及伤口修复等。在伤口修复的过中，粘连蛋白聚糖 -1 的表达升高能使细胞对成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子以及转化生长因子 -13 等效应分子的反应性提高，从而调节细胞的增生和迁移[3]。Lee[12]用 PR-39 转基因治疗老鼠皮肤切口感染发现与没有转基因的老鼠相比，其伤口的细菌含量更低，伤口的炎症反应更轻，愈合得更早。这为将来 PR-39 用于治疗外科感染提供了参考。

本实验构建的载体 pGC-FU-PR-39 包含 PR-39 CDS 区全序列共 516 bp，编码 172 个氨基酸，形成的 PR-39 抗菌肽前体（Antibacterial protein precursor）它分为 3 个区域，其中前面 29 个氨基酸是信号肽，作用是引导抗菌肽到细胞膜最终分泌到胞外；中间第 30 到 130 位氨基酸形成前肽，含有 4 个半胱氨酸形成的二硫键和高度分散的羧基末端，该区域带负电荷中和后面的成熟肽的正电荷以阻止抗菌肽对转染细胞自身的毒性作用；后面 131 到 169 位氨基酸构成含 39 个氨基酸的成熟肽，即通常说的 PR-39 抗菌肽，带正电荷，是主要的功能肽，在弹性蛋白酶的作用下从前体肽中脱离。文阳安[13]等曾成功构建了包含 PR-39 成熟肽基因序列的真核表达载体并转染巨噬细胞用于抗巨噬细胞内细菌取得了成功。但是因为他没有加入信号肽，巨噬细胞不能分泌 PR-39 对抗胞外菌。本实验构建的 PR-39 CDS 全序列真核表达载体，它能够让宿主细胞分泌出抗菌肽 PR-39，同时我们在目的基因前面加入了表达增强序列 CGCCACC 增强目的基因的表达，为基因工程合成 PR-39 以及进一步研究 PR-39 的生物学活性做准备。

参 考 文 献

[1] Gennam R, Zanetti M, Beaincasa M, et al. Pro-rich anti icrobial petides from animals structure, biological functions and mechanism of action[J]. Curr Pham Des, 2002, 8(9): 763-778.

[2] Delfino D, Cusumano V V, Tomasello F, et al. Beneficial effects of antibacterial peptide PR-39 in a neonatal murine model of endotoxic shock.[J]. New Microbiol, 2004, 27(4): 369-374.

[3] Li W F, Ma G X, Zhou X X, et al. Apidaecin-type peptides: biodiversity, structure-function relationships and mode of action[J]. Peptides, 2006, 27(9): 2350-2359.

[4] Wu J, Parungo C, Wu G, et al. PR39 inhibits apoptosis in hypoxic endothelial cells: role of inhibitor apoptosis protein-2[J].Circulation, 2004, 109(13): 1660-1667.

[5] Broqden K A, Ackermann M, Mccray P B, et al.Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences[J]. Int J Antimicrob Agents, 2003, 22(5): 465-478.

[6] Vunnam S, Juvvadi P, Memifield R B, et al. Synthesis and antibacterial action of cecropin and proline-arginine-rich peptides from pig intestine[J]. J Pept Res, 1997, 49(1): 59-66.

[7] Linde C M, Hoffner S E, Refai E, et al. In vitro activity of PR-39, a proline-arginine-rich peptide, against susceptible and multi-drug-resistant Mycobacterium tuberculosis[J]. J Antimicrob Chemother, 2001, 47(5): 575-580.

[8] Boman H G, Agerberth B, Boman A, et al. Mechanisms of action on Escherichia coli of cecropin-P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine [J]. Infect Immun, 1993, 61(7): 2978-2984.

[9] Boman H G.Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts [J]. Journal of Internal Medicine, 2003, 254(3): 197-215.

[10] Djanani A, Mosheimer B, Kaneider N C, et al. Heparan sulfate proteoglycan-dependent neutrophil chemotaxis toward PR-39 cathelicidin[J]. J Inflamm (Lond), 2006, 3(1): 14.

[11] Shi J, Ross C R, Loto T L, et al. PR-39, a proline-rich antibacterial peptide that inhibits phagocyte NADPH oxidase activity by binding to Src homology 3 domains of p47 phox[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 6014-6018.

[12] Lee P H, Ohtake T, Zaiou M, et al. Expression of an additional cathelicidin antimicrobial peptide protects against bacterial skin infection [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(10): 3750-3755.

[13] 文阳安，郭金英，余晓林，等.抗菌肽 PR39 真核表达载体的构建及其在巨噬细胞中的表达和抗菌作用[J].第三军医大学学报，2008，30(21)：2044-2046.

（责任编辑：关蕴良）