DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.07.023
第25卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 7
2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

文章编号:1000-5404(2003)07-0617-03

论著

人β-防御素3的cDNA克隆和表达载体的构建

陈 姗,董燕麟,何凤田,李蓉芬,高会广,陈 敏,彭家和 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 克隆人β-防御素3(hβD-3)cDNA并构建其原核表达载体,为更深入的抗菌肽活性研究及制备新型肽类抗生素创造条件。方法 从人扁桃体组织中提取总RNA,经RT-PCR扩增编码hβD-3成熟肽的cDNA序列,将其克隆至pUC18载体进行序列测定,然后构建于新型原核表达载体pQE-80L中。结果 RT-PCR扩增得到约135 bp的目的DNA片断,序列分析与GenBank中报道的编码hβD-3成熟肽的cDNA序列完全一致。结论 hβD-3 cDNA的克隆和原核表达载体的构建,为进一步制备抗耐药菌的肽类抗生素奠定了基础。

关键词:抗菌肽;人β-防御素3;基因克隆
中图法分类号:R516;R782;R394-33 文献标识码:A

Cloning of human beta-defensin-3 and construction of its expression vector

CHEN Shan, DONG Yan-lin, HE Feng-tian, LI Rong-fen, GAO Hui-guang, CHEN Min, PENG Jia-he (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone the cDNA encoding human beta-defensin-3 and construct its prokaryotic expression vector for the purpose of providing evidence for further studies of the activities of antimicrobial peptides and the preparation of new type of peptide antibiotics. Methods The total RNA, extracted from human tonsil, was amplified into the sequence of cDNA encoding hβD-3 by RT-PCR and then cloned into vector pUC18 for sequencing. Next, the identified cDNA was cloned into the new type of prokaryotic expression vector pQE-80L. Results A 135 bp-length DNA fragment was obtained by RT-PCR amplification. Sequence analysis indicated that the DNA was identical to the sequence reported in GenBank. Conclusion The cloning of cDNA encoding hβD-3 and construction of its prokaryotic expression vector provide evidence for the preparation of the antimicrobial peptide.

Key words: antimicrobial peptide; human beta-defensin-3; gene cloning

抗生素在防治感染中发挥了巨大作用,但由于抗生素的不合理使用等原因导致了大量耐药菌的出现,细菌耐药已成为当今临床治疗中面临的日益严重的问题。人们正从各方面尝试解决之道,抗菌肽(Antimicrobial peptide)的研究为这一问题的解决带来了希望[1,2]。抗菌肽又名肽抗生素(Peptide antibiotics),是一种生物体产生的阳离子小分子多肽,广泛存在于植物和动物体内,是生物天然免疫的重要组成部分。抗菌肽有不同的分类方法. 根据结构和功能的不同,可分为四类:杀菌肽类(Cecopins),防御素(Defensin),蛙皮素(Magainin)—富含脯氨酸的多肽(Proline-rich peptides),蜂黄素(Melittin)—富含甘氨酸的多肽(Glysine-rich peptides)。防御素是其中较为重要的一种[3~5]。

防御素(Defensin)主要来源于皮肤、呼吸道等的上皮组织,遇到病原微生物刺激时表达增强,是正常机体抵抗外界病原微生物入侵的重要防线。防御素具有强大的抗菌功能,因此人们把防御素看作是一个对付细菌耐药的可能的突破口而对其投入了较大的关注,其中最为引人注目的是β-防御素[6,7]。人β-防御素3(Human beta-defensin 3, hβD-3)是新近被克隆出来的第三种人源性β-防御素,它在抗菌谱和盐离子敏感度等方面表现出了与其它几种人β-防御素不同的特性和优越性,而被认为具有独特的研究和开发价值[8]。要获得大量的hβD-3,基因工程是首选,尤其是利用原核表达系统,可以较简便地获得较大量的表达产物。本试验以自人扁桃体中提取的总RNA为模板,利用RT-PCR技术,扩增了编码hβD-3成熟肽的cDNA序列,并构建于新型原核表达载体PQE-80L,为进一步利用大肠杆菌表达活性hβD-3打下了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

pUC18质粒购自华美公司;pQE80-L质粒由美国贝克曼癌症研究所周度金教授惠赠。大肠杆菌JM109和DH5α由本室保

作者简介:陈 姗(1976—),女,四川省隆昌市人,硕士研究生,助教,主要从事蛋白质方面的研究 电话:(023)68752261
通信作者:何凤田,电话:(023)68752262
收稿日期:2002-09-10;修回日期:2002-12-13

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

存。Tripure Isolation Reagent 及 High Pure PCR Product Purification Kit 为 Roche 公司产品；Access RT-PCR System 为 Promega 公司产品；限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ、RNA PCR Kit(AMV)、T4DNA ligation 以及 DNA Marker DL-2000 购自大连 TaKaRa 公司；PCR 引物由上海生工公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞总 RNA 的提取 收集手术切除的人扁桃体组织，立即置液氮中。采用 Tripure 试剂盒提取细胞总 RNA，操作步骤按说明书进行。

1.2.2 RT-PCR 扩增人β-防御素 3 cDNA 根据 GenBank 中编码 hβD-3 成熟肽 45 个氨基酸的 cDNA 序列，设计特异引物，上游引物为 5′-CCGGTACCGGAATCATA AACACATTACAG-3′（划线部分为 *Kpn* Ⅰ 酶切位点），下游引物为 5′-CCAAGCTTT-TATTTCTTTCTTCGGCAGCA-3′（划线部分为 *Hind* Ⅲ酶切位点）。RT-PCR 按试剂盒说明进行：RNA 1 μg/5 μl，5× 反应 buffer 10 μl，上、下游引物各 2 μl（终浓度为 50 pmol），dNTP 1 μl，AMV 反转录酶 1 μl（5 U），Tfl DNA 聚合酶 1 μl（5 U），25 mmol/L $MgSO_4$ 2 μl，ddH_2O 26 μl，总体积为 50 μl。48 ℃ 45 min，94 ℃预变性 2 min，然后 94 ℃ 30 s，60 ℃ 1 min，68 ℃ 2 min，40 个循环，最后 68 ℃ 延伸 7 min。

1.2.3 扩增产物的鉴定 取 10 μl RT-PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶中电泳，凝胶扫描仪下观察并记录结果。

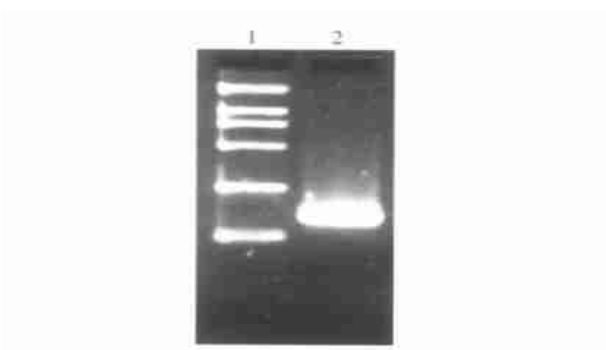
1.2.4 序列测定 PCR 产物及载体 pUC18 经 *Kpn* Ⅰ + *Hind* Ⅲ双酶切后分别用纯化试剂盒进行回收。回收产物按常规连接条件于 16 ℃连接 12 h，取 5 μl 连接产物转化于大肠杆菌 JM109 感受态细胞，经蓝白筛选获得阳性重组子，继而提取质粒，经 *Kpn* Ⅰ + *Hind* Ⅲ双酶切鉴定，重组质粒命名为 pUC18/hβD-3。DNA 序列测定由上海生工公司完成。

1.2.5 原核表达载体的构建 将 pUC18/ hβD-3 进行 *Kpn* Ⅰ + *Hind* Ⅲ双酶切，回收目的片段并连接于原核高效表达载体 pQE-80L，经酶切鉴定，得到重组原核表达载体 pQE-80L/ hβD-3。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增人β-防御素 3 cDNA

扩增产物行电泳后，可见清晰条带，片段大小约为 140 bp，见图 1。



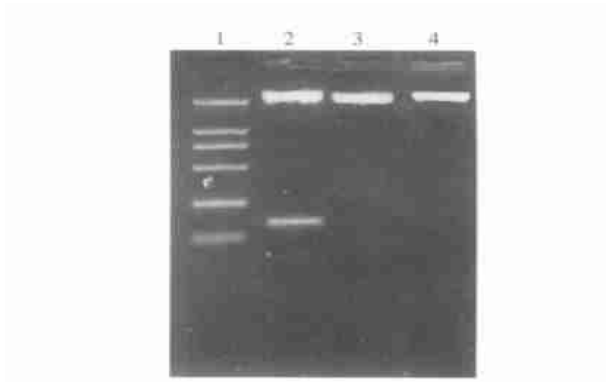
1：DNA marker DL 2000；2：The amplified cDNA encoding hβD-3

图 1 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig 1 Map of RT-PCR product by agarose gel electrophoresis

2.2 阳性重组子 pUC18/ hβD-3 的筛选

阳性重组子 pUC18/ hβD-3 经 *Kpn* Ⅰ + *Hind* Ⅲ双酶切后，可见大小约为 140 bp 的目的片段，见图 2。



1：DNA marker DL 2000；2：pU18/hβ D-3/*Kpn* Ⅰ + *Hind* Ⅲ；3：pUC18/*Kpn* Ⅰ + *Hind* Ⅲ；4：pUC18/hβ D-3

图 2 重组质粒 **pUC18/hβD-3** 的酶切鉴定

Fig 2 Restriction map of recombinant plasmid pUC18/hβ D-3

2.3 DNA 序列测定

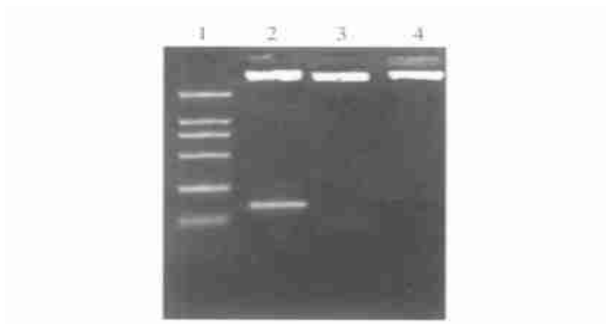
所获针对 hβD-3 成熟肽的 cDNA 序列如下：

GG AATCATAAAC ACATTACAGA AATATTATTG CAGAGTCA-GA GGCGGCCGGT GTGCTGTGCT CAGCTGCCTT CCAAAGGAGG AACAGATCGG CAAGTGCTCG ACGCGTGGCC GAAAATGCTG CC-GAAGAAAG AAATAA

序列全长 135 bp，经查对与 GenBank 上编码相应片段的序列完全一致。本序列作为自中国人克隆的 hβD-3 被 GenBank 登录，登录号为 AF516673。

2.4 阳性重组子 pQE-80L/ hβD-3 的筛选

阳性重组子 pQE-80L/ hβD-3 经 *Kpn* Ⅰ + *Hind* Ⅲ双酶切后，可见大小约为 135 bp 的目的片段，见图 3。



1：DNA marker DL 2 000；2：pQE-18L/hβD-3/*Kpn* Ⅰ + *Hind* Ⅲ；3：pQE-18L/*Kpn* Ⅰ + *Hind* Ⅲ；4：pQE-18L/hβD-3

图 3 重组质粒 **pQE-80L/ hβD-3** 的酶切鉴定

Fig 3 Restriction map of recombinant plasmid pQE-80L/ hβD-3

3 讨论

防御素是抵抗病原微生物入侵的第一道天然防

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

线, 包括 α-防御素和 β-防御素两种[9, 10]。1999 年自恒河猴白细胞中克隆的 θ-防御素实质上是一个环状的 α-防御素九聚体[11]。β-防御素最初提取自牛舌。目前人们已发现了 4 种人体的 β-防御素(Human beta-defensin, hβD)。hβD-1 由 Bensch 等于 1995 年从肾衰患者透析液中获得, hβD-2 是 Harder 等[12] 于 1997 年从银屑病患者上皮中分离得到。hβD-3 是 2001 年 Harder 等从银屑病人皮损部位的皮肤中首次分离获得。hβD-4 也是 2001 年首次分离获得, 但是只在感染时选择性表达于某些组织。前两种人β 防御素都具有很强的抗菌能力, 但主要是对革兰阴性菌如: 大肠杆菌, 绿脓假单胞菌等, 对于现在耐药最严重并引起从皮肤脓疮到心肌炎、中毒性休克等一系列临床病症的革兰阳性菌(如金黄色葡萄球菌)却只表现出很低的抗菌活性。而 hβD-3 在很小剂量范围内就表现出对金黄色葡萄球、耐万古霉素的肠球菌、化脓链球菌等革兰氏阳性菌的抗菌活性。此外, hβD-3 是非盐离子浓度敏感性的, 也就是说对于低生理盐浓度, 正常生理盐浓度和略高于生理盐浓度的情况, 它都能表现良好的抗菌活性, 因此它对于因局部盐浓度过高而引起其它抗菌肽失效的病人(如囊性纤维化患者)可望有好的抗菌作用。同时在生理盐浓度范围内, 即使使用高于抗菌浓度几十倍的用量, 它也不会攻击真核细胞, 即不会引起在其它抗菌肽可能出现的溶血。因此, hβD-3 表现出了独有的优越性而具备研究和开发价值。

人β-防御素 3 由 67 个氨基酸组成, 经剪切后形成 45 个氨基酸的活性肽, 具有抗耐药革兰阳性菌等抗菌活性, 并且具有不溶血、不依赖离子盐浓度等特点。对其抗菌能力的形态学研究显示, 经 hβD-3 处理的金黄色葡萄球胞壁上出现穿孔, 并在短时间内呈现细胞的崩溃裂解, 但具体机制尚不清楚。

由于 hβD-3 在人体正常组织中的含量很少, 分离纯化难度较大, 通过提取所能获得的 hβD-3 的量是极其有限的。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 hβD-3 成为首选之路。虽然真核表达系统可以实现有效的转录、表达和后期加工, 但表达水平一般都较低。文献[8] 报道, 通过原核表达系统获得的重组 hβD-3 在抗菌活性、生化特征上与提取的天然 hβD-3 毫无差异。因此我们仍选用原核表达系统来表达 hβD-3。因为原核细胞不具有加工修饰的能力, 因此我们直接将编码活性肽 45 个氨基酸的 cDNA 与载体连接。利用原核表达系统来获得抗菌肽的关键难点在于由于表达的蛋白具有抗菌活性, 会杀死宿主菌, 即所谓的工程菌表达"毒性"蛋白时的"自杀"问题。我们选用的 pQE-80L 载体不仅高效表达, 可以使表达的目的蛋白达到细胞总量的 50%, 而且带有 lac 抑制子, 在未加入诱导剂 IPTG 以前, 转录不启动, 具有"毒性"的目的蛋白不表达, 故并不影响宿主菌的生长。在宿主菌生长到一定数目以后, 再加入 IPTG 诱导生长, 就可获得大量表达的目的蛋白。此外, 使用 pQE-80L 载体表达的目的蛋白 N 端带有 His-tag, 易于通过镍柱分离纯化。

本研究已成功地扩增了编码 hβD-3 活性肽的 cDNA, 并将其构建于于高效表达载体 pQE-80L 上, 为下一步的蛋白表达、纯化及生物学活性研究奠定了基础。

参考文献:

[1] Hancock R E, Chapple D S. Peptide antibiotics[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(6): 1317—1323.

[2] Cole A M, Ganz T. Human antimicrobial peptides: analysis and application [J]. Biotechniques, 2000, 29(4): 822—826, 828, 830—831.

[3] Bals R. Antimicrobial peptides and peptide antibiotics[J]. Med Klin, 2000, 15, 95(9): 496—502.

[4] Lehrer R I, Ganz T. Defensins of vertebrate animals[J]. Curr Opin Immunol, 2002, 14(1): 96—102.

[5] Garcia-Olmedo F, Rodriguez-Palenzuela P, Molina A. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence[J]. FEBS Lett, 2001, 498(2-3): 219—222.

[6] Yang D, Chertov O, Oppenheim J J, *et al*. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity[J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58(7): 978—989.

[7] Bos J D, Pasch M C, Asghar S S. Defensins and complement systems from the perspective of skin immunity and autoimmunity[J]. Clin Dermatol, 2001, 19(5): 563—572.

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

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

[11] Tang Y Q, Yuan J, Osapay G, *et al*. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α-defensins [J]. Science, 1999, 286(5439): 498—502.

[12] Schroder J M, Harder J. Human beta-defensin-2[J]. Int J Biochem Cell Biol, 1999, 31(6): 645—651.

(编辑　王　红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net