DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.005
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

文章编号:1000-5404(2002)04-0389-04

论著

一个承载分子的设计与肽抗生素 hPAB-β 的高效表达

饶贤才,金晓琳,胡晓梅,朱军民,陈自瑾,胡福泉 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室、重庆市微生物工程重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 通过设计一个承载蛋白分子高效表达肽抗生素 hPAB-β,为大量制备 hPAB-β 奠定基础。方法 根据肽抗生素的特性,确立 4 条设计原则,并据此设计一 489bp 的承载蛋白编码序列,用化学合成法获得该序列并将之克隆到 pQE-32 中构建成表达载体,进一步将肽抗生素 hPAB-β 基因插入上述表达载体,肽抗生素基因位于承载蛋白编码序列 3′-端,两者构成融合基因。将含融合基因的表达载体转化大肠杆菌 JM109,筛选阳性重组子,并用阳性重组子表达融合蛋白。结果 设计的承载蛋白为 163 个氨基酸,分子量 17668.80,等电点 5.621。用承载分子与肽抗生素 hPAB-β 构建的融合蛋白表达载体转化细菌后,筛选到 4 个阳性重组子,均能高效表达肽抗生素融合蛋白,融合蛋白的产量占细菌总蛋白的 40%~45%。结论 设计的承载蛋白分子能够实现肽抗生素的高效表达。

关键词:承载蛋白;肽抗生素;高效表达
中图法分类号:R392-33;R394.3;R978.1 文献标识码:A

Design of a carrier molecule and high level expression of peptide antibiotics hPAB-β

RAO Xian-cai, JIN Xiao-ling, HU Xiao-mei, ZHU Jun-ming, CHEN Zi-jin, HU Fu-quan (Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To design a carrier protein molecule which can express peptide antibiotics hPAB-β at high level. **Methods** According to the properties of peptide antibiotics, a 489 bp DNA sequence coding for the carrier protein was designed under the help of DNAStar software. An expression plasmid pQE-CH was constructed by inserting the fusion gene of designed DNA and peptide antibiotics hPAB-β into pQE-32 plasmid. After the plasmid was transformed into *E. coli* JM109, 4 positive recombinants were selected and used to express the fusion proteins. **Results** All 4 selected recombinants containing the fusion gene of the designed carrier protein sequence and peptide antibiotics hPAB-β expressed the fusion protein at high level about 40% to 45% of total cell proteins. **Conclusion** Expression plasmid pQE-CH constructed from the designed carrier molecule and hPAB-β expresses peptide antibiotics hPAB-β at high level.

Key words: carrier molecule; peptide antibiotics; high expression.

肽抗生素(Peptide antibiotics)是昆虫、动物、植物以及人体基因编码的具有抗生素样活性的肽类物质,因其抗菌活性强、且具有抗菌广谱性,在临床感染菌对常规抗生素的耐药性日益严重的今天,肽抗生素的研究得到广泛重视,一方面,人们试图通过研究弄清不同种属动植物肽抗生素的结构、分布、表达的调控机制;另一方面,也是人们最感兴趣的方面,即研究肽抗生素的药用开发价值,努力使之成为继青霉素等传统的抗生素之后又一类新型的抗菌药物[1]。

目前制备肽抗生素的技术方法主要有化学合成、真核表达、原核表达等。化学合成的成本高;真核表达系统在表达真核基因时可以有效地转录和翻译,准确地完成糖基化,磷酸化,二硫键的形成以及翻译后的剪切等加工过程,能较客观地表达天然蛋白质的结构和功能,但真核表达系统往往表达水平较低;通过构建适宜的表达载体利用原核表达系统可获得较高的产量,降低生产成本,但用原核表达系统生产具有抗菌活性的肽抗生素时面临两个难题:一是肽抗生素对原核细胞(如细菌)具有抑杀作用,不易于用原核表达系统直接表达,其二,肽抗生素为小分子,表达产物不稳定,产量不高[2]。

本研究根据肽抗生素的特性,设计了一承载蛋白分子(Carrier protein molecule),通过构建肽抗生素与承载分子的融合蛋白表达载体,不仅很好地解决了原核表达中肽抗生素对宿主菌的毒性问题,而且可以实现肽抗生素在大肠杆菌中的高效表达。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

表达质粒 pQE-32 为 Qiagen 产品,重组了人源肽抗生素 hPAB-β 的 pFAST-hPAB-β 由本室构建,大肠杆菌 JM109, DH5α 由本室保存。

1.2 承载分子的设计

根据肽抗生素为小分子(多由 13~60 个氨基酸组成)短

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39980037, 30171119);全军"十五"科研基金重点资助项目(01Z070);重庆市攻关课题资助项目(2000)
作者简介:饶贤才(1967—),男,浙江省江山市人,博士研究生,副教授,主要从事抗微生物感染方面的研究,发表论文 20 篇。电话:(023)68752239
通信作者:胡福泉,电话:(023)68752240, E-mail: hufuquan@yahoo.com
收稿日期:2002-01-29;修回日期:2002-03-10

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

肽、分子量在 4× 10^3 左右，富含带正电荷氨基酸（精氨酸、赖氨酸等）等特性[4]，我们设计的适用于高效表达肽抗生素的承载分子符合以下原则：① 作为小分子肽表达的承载体，设计的承载分子要大于目的肽分子 2 倍以上，便于在生产过程中利用层析方法分离承载蛋白和目的肽。②设计中使承载蛋白的等电点远离要表达的目的肽等电点，如设计承载蛋白的等电点 pI 在 5.0～6.5 之间，则该承载蛋白在中性（pH 7.0）条件下带负电荷，可有效中和肽抗生素的正电荷，从而使融合蛋白的等电点趋于中性，便于其在宿主菌体内稳定存在，以及在随后的纯化过程中利用离子交换层析分离承载蛋白和目标肽。③设计中要使承载蛋白的亲水性好，以使融合蛋白有更好的水溶性，便于随后的蛋白复性、纯化等操作。④在承载蛋白与目的肽的连接处加上适当的蛋白酶酶切或化学裂解位点，以便在产物纯化阶段能方便地切割和分离出目的肽。例如，要用化学试剂 CNBr（识别位点为蛋氨酸）作为裂解融合蛋白的方法，则除了要生产的目的肽分子内不能含蛋氨酸外，在承载蛋白的分子内也不能有（起始密码子编码的蛋氨酸除外），只能在承载蛋白与肽抗生素的连接处含有一个唯一的蛋氨酸。

根据上述承载蛋白的设计原则，在 DNAStar 软件包 Editseq 和 Protean 软件的协助下，设计了一 489 bp 的 DNA 序列，该序列编码 163 个氨基酸组成的承载分子，分子量 17668.80，等电点为 5.621，含 103 个亲水性氨基酸，60 个疏水性氨基酸。

1.3 承载分子的合成

由于目前的合成法尚无法一次性合成长度达 489 bp 的 DNA 序列，故为获得所设计的承载分子序列，我们将之分成 5 段来合成，相邻寡核苷酸序列的 3′-端或 5′-端有 15 bp 的互补序列，在第一段寡核苷酸的 5′-端加上 *Sma*I 位点，第二段及第四段序列与承载分子对应序列反向互补，第五段的 3′-端有一 *Kpn*I 位点。另外，为用引物延伸法生成承载分子序列，合成了一条与第五段寡核苷酸的 3′-端互补的引物 P。

所有寡核苷酸均由上海生工合成，将合成的 5 段寡核苷酸和引物 P 分别溶解于 pH 8.0 的 TE 缓冲液中，用引物延伸法生成承载分子序列[3]。即取等摩尔分子混合，加水至 14 μl，70 ℃温育 5 min，加 2 μl 10× Klenow buffer，降温至 50 ℃并保持 60 min（退火），再加 2 μl 4× dNTP，5 μl Klenow 酶，30 ℃ 3 h，继续补加 T_4 DNA 连接酶 2 μl，22 ℃ 2 h，最后加 2 μl 0.5 mol/L EDTA 终止反应，1%的琼脂糖凝胶电泳并回收约 500 bp 的承载分子编码序列。

1.4 承载分子表达载体的构建

将表达质粒 pQE-32 用 BamHI 酶切后用大肠杆菌 Klenow 酶补平，回收线性化产物，再用 KpnI 酶切，回收备用。

用 *Sma*I 和 *Kpn*I 酶切合成的承载分子，进一步将酶切产物与线性化的 pQE-32 质粒连接，转化大肠杆菌 DH5α，筛选阳性重组子，将阳性重组子命名为 pQE-CP。

1.5 肽抗生素 hPAB-β 融合蛋白表达载体的构建

将克隆了肽抗生素 hPAB-β 的 pFAST-hPAB-β 质粒用 *Ehe*I 和 *Hind*Ⅲ双酶切后回收含 hPAB-β 片段，将之插入上述构建好的 pQE-CP 的 *Sma*I/*Hind*Ⅲ位点，转化大肠杆菌 JM109，用 PCR 及核苷酸测序鉴定阳性重组子，并将获得的肽抗生素 hPAB-β 与承载分子融合蛋白表达载体命名为 pQE-CH。

1.6 肽抗生素的表达

将融合蛋白表达质粒 pQE-CH 转化 JM109 大肠杆菌，挑取 AMP 抗性菌落，扩大培养于 2 ml 含 100 μg/ml AMP 的 LB 培养基中，37 ℃培养过夜（16～18 h），次日取 50 μl 过夜菌培养于 5 ml LB 培养基中（1%，V/V），37 ℃振荡培养至 OD600 为 0.5～0.6 时，加 IPTG（终浓度为 1 mmol/L）诱导培养 4 h，用 SDS-PAGE 分析融合蛋白的表达情况。

2 结果

2.1 本实验设计的承载分子序列（489 bp）：

ctcctatctaagagcctagaggatcatgaggcgggggtatgccctttgggctgccccctac
tgcttagctgactatgagagaatttgggtgtacgagtggtaagttctgtagctgcatctaat
gataaggtagaggtggatcccaatggaatcaaagcaggagatccgggggctaagctcg
ataagggcaaggtggatgttggaatcatcttcgaagcgttcccgagagcttcttatgcggt
ggcacaagttgctaacttcggagcaagcaaatatagtcgcgggggttggaggttcgtcga
gaacggaatacagcgatatgatgctgccttcggacgacacctccttgagcgacacaagg
gtgaggtttggaccccccaaagtagtttaccccaccggtatcacgaagtttggaacgccc
tagcagcccctagagctggtaatccaacaagaggagggttctaatggaacttctactggatc
cgagggc

将设计的序列送入 GenBank（http://www.ncbi.nlm.nih.gov）序列库用 blastn 进行 DNA 同源序列检索，结果检索到 8 段序列与设计序列有同源性，其中 6 段为 19 bp，另 2 段为 22 bp 与设计序列的局部区域相同，表明我们设计的承载分子是目前 GenBank 序列库中没有收录的新序列。

2.2 承载分子及肽抗生素融合蛋白表达载体的构建

将合成的寡核苷酸用引物延伸法生成所设计的承载分子，经 *Sma*I 和 *Kpn*I 酶切后，插入 pQE-32 表达质粒的 *BamH*I（切后补平）/*Kpn*I 位点，转化大肠杆菌 DH5α，从 AMP 抗性平板挑取的 6 个菌落中有 4 个克隆质粒明显滞后，纯化 4 号质粒（命名为 pQE-CP4），进一步用承载分子引物作 PCR 扩增鉴定，结果见图 1。



1：pFAST-hPAB-β positive control；2：Negative control；3：1 kb DNA Marker；4：pQE-CP4 PCR products by carrier molecule primer；5～8：Fusion protein expression plasmids pQE-CH PCR products by peptide antibiotics hPAB-β primers

图 1 承载蛋白及融合蛋白表达载体的 PCR 扩增鉴定

Fig 1 Identification of fusion protein expression plasmids with PCR

用 *Ehe*I 和 *Hind*Ⅲ从 pFAST-hPAB-β 质粒中酶切出含肽抗生素 hPAB-β 片段，插入 pQE-CP4 的 *Sma*I/*Hind*Ⅲ位点，构建融合蛋白表达载体，转化大肠杆菌 JM109。融合蛋白表达载体的构建策略见图 2。

2.3 融合蛋白表达载体的鉴定

挑取 4 个 AMP 抗性菌落，培养于 2 ml LB 中，提取质粒，用

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

肽抗生素 hPAB-β 引物作 PCR 检测鉴定, 结果见图 1。对其中的 2 号阳性重组子用 hPAB-β 下游基因引物进行核苷酸测序鉴定, 证实阅读框正确。

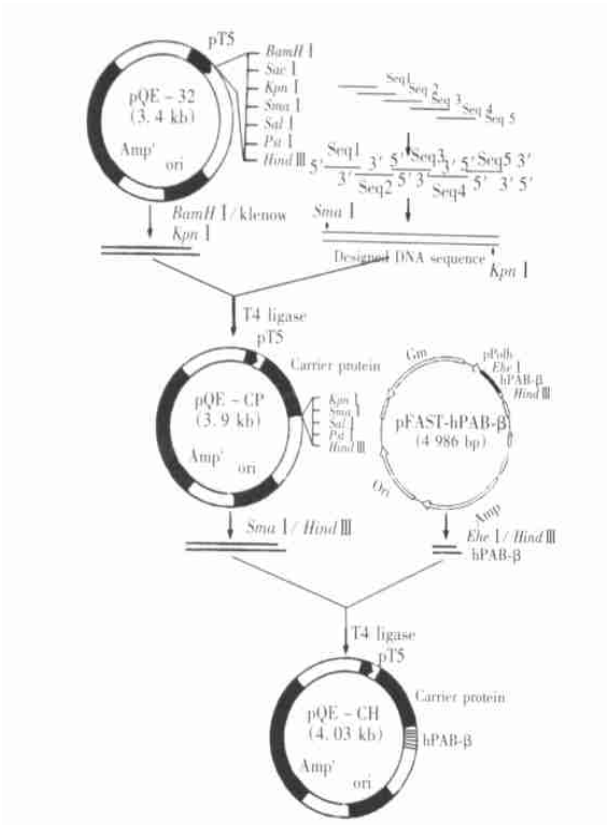
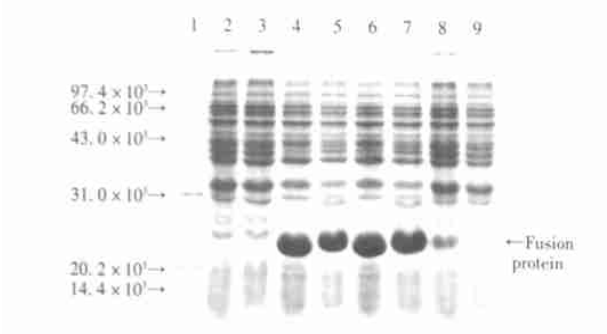


图 2　融合蛋白表达载体的构建

Fig 2　Construction of expression plasmid

2.4　融合蛋白表达

培养 4 株含肽抗生素与承载分子融合蛋白表达载体的 JM109 工程菌, 用 IPTG(终浓度 1 mmol/L)诱导融合蛋白表达, 表达菌行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果见图 3。经凝胶扫描分析, 融合蛋白的表达量占菌体总蛋白的 40% ~ 45%。



1: Protein marker for low molecular mass; 2 8 9: E. coli JM109 strain; 3: pQE-CP plasmid transformed JM109; 4—7: pQE—CH plasmid transformed JM109

图 3　融合蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Fig 3　SDS-PAGE analysis of expressed fusion proteins

3　讨论

目前, 获得肽抗生素主要有化学合成、基因工程等方法[4]。为了研究肽抗生素的活性、作用机制, 许多天然肽抗生素及其类似物可通过固相合成的方法得到。例如, 为了寻找具有更高抗菌活性或更广抗菌谱的肽抗生素, 一些杂合肽相继被合成, 象由 cecropin 和 melitin 的前 13 个氨基酸组成的杂合肽 CN(1 ~ 13)MN(1 ~ 13)具有很强的抗菌活性而无溶血活性[5]。化学合成法可以方便地在合成过程中改变多肽的一级结构, 加入特殊氨基酸, 对多肽末端进行修饰, 但是随着合成肽链的增长, 昂贵的合成成本是限制该方法工业化应用的最大障碍。利用基因工程的方法生产肽抗生素则是降低生产成本的一条有效途径, 但真核表达系统的较低表达效率极大地限制了其在工业化生产中的应用; 利用原核系统生产肽抗生素又面临目的分子对宿主菌有毒性, 不便用原核表达系统直接生产以及目的分子为小分子, 表达产物不稳定, 产率不高等问题。

为克服肽抗生素对细菌细胞的毒性, 人们采用融合表达路线[6,7]。最早 Jaynes 于 1989 年在大肠杆菌中融合表达了 Shiva-I 基因; Piers 等[8]将 defensin, HNP-1, cecropin/melittin 杂合肽基因分别与 4 个不同的承载蛋白相融合, 并在大肠杆菌中进行表达, 结果表明不同的承载蛋白对肽抗生素的表达效率不同; Lee 等将肽抗生素 MSI-344 融合于大肠杆菌截短的 Purf 承载蛋白上, 结果使融合蛋白的表达产量提高到占细菌总蛋白的 30%[9]。可见, 通过筛选不同的承载蛋白分子, 构建肽抗生素融合蛋白表达载体, 转化原核细胞, 可以获得高产率的基因工程菌。

我们在前期工作中, 通过设计通用引物, 从人皮肤角朊上皮细胞中克隆到了肽抗生素 hPAB-β, 也曾将之克隆到 pinpoint Xa-3 质粒中构建成融合蛋白表达质粒, 转化 JM109 大肠杆菌进行表达, 首代表达的融合蛋白约占细菌总蛋白的 12%, 随后表达量逐渐下降, 当工程菌传至第五代就见不到融合蛋白电泳条带; 后来将阳性重组子转化入蛋白酶缺陷 BL21 株大肠杆菌, 首代融合蛋白表达量达到占细菌总蛋白的 20%, 但在传至 11 代后, 工程菌不再表达融合蛋白。经查, 工程菌中的阳性重组子并未丢失, 但其逐渐丧失融合蛋白表达能力的原因不甚清楚。在饱尝失败之后, 我们提出了本研究所述的承载分子设计原则, 并在该原则的指导下设计并克隆了一个承载蛋白分子, 通过构建肽抗生素 hPAB-β 与承载分子的融合蛋白表达载体, 获得 4 个阳性重组子, 它们均能高效表达融合蛋白, 产量分别达细菌总蛋白的 42.4%、40.7%、45%和 43.4%. 目前文献[9]报道的肽抗生素融合蛋白表达量最高的为 30%。为观察设计的承载蛋白分子在表达肽抗生素融合蛋白时是否稳定, 我们已将 4 号重组子所在的工程菌连续传了 30 多代, 表达分析表明其表达效率没有降低。

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

这些结果也反过来证实我们提出的承载分子设计原则是有效的。由于承载分子的设计兼顾融合蛋白表达、裂解及承载分子与目标肽的分离等方面，故高效表达工程菌的获得为后续肽抗生素的制备奠定了坚实的基础。

参考文献：

[1] Miyasaki K T, Lehrer R I. Beta sheet antibiotic peptides as potential dental therapeutics[J]. Inter J Antimicrobial Agents, 1998, 9(2): 269—280.
[2] Andreu D, Rivas L. Animal antimicrobial peptides: an overview[J]. Biopolymers, 1998, 47(6): 415—433.
[3] Lee J H. Genetic analysis[J]. Biomolecular engineering. 1996, 13(1): 139—145.
[4] Steiner H, Hulkmark D, Engstrm A, *et al*. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity[J]. Nature, 1981, 292(5820): 246—248.
[5] Selsted M E, Brown D M, Delange R J, *et al*. Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages[J]. J Biol Chem, 1983, 258(6): 14 485—14 489.
[6] Boman H G, Wade D, Boman I A, *et al*. Antibacterial antimalarial properties of peptide that are cecropin-mellitin hybrids[J]. FEBS Lett, 1989, 259(1): 103—106.
[7] Reichhart J M, Petit I, Iegrain M, *et al*. Expression and secretion in yeast of active insect defesin, an inducible antibacterial peptide from the fleshfly Pomia terranova[J]. Invert Peprod Dev, 1992, 21(1): 15—24.
[8] Peir K L, Brown M H, Hancock R E W. Recomcinant DNA procedures for producing small antimicrobial cantionic peptides in bacteria[J]. Gene, 1993, 134(1): 7—13.
[9] Lee J H, Kim J H, Hwang S W, *et al*. High-level expression of antimicrobial peptide mediated by a fusion partner reinforcing formation of inclusion bodies [J]. Biochemical and Biophysical Research, 2000, 277(3): 575—580.

（编辑 冷怀明）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)04-0392-01

双子宫、左子宫妊娠、左侧阴道中下段闭锁不全致药物流产失败 1 例

A case of medicine abortion failure induced by double uterus, cyesis of left uterus and insufficiency of left vagina

周 莉，姜娅莉 （解放军 324 医院妇产科，重庆 400020）

患者 23 岁，已婚，平素月经规律，量中等，偶有痛经，孕 2 产 0。2000 年 6 月因早孕于外院行人流术，被告之系双子宫，右侧子宫妊娠，左侧宫腔无法探入。末次月经 2000 年 12 月 18 日，2001 年 3 月 2 日来我院要求终止妊娠。妇检：单阴道，粘膜正常，单宫颈，左侧子宫约孕 2 月大小，右侧 子宫稍大，B 超示：左侧子宫妊娠。考虑：① 早孕；② 双子宫？③双角子宫？因左宫腔无法探入，门诊给予药物流产。当日开始口服米非司酮 25 mg，每日 2 次，连服 3 d，3 月 5 日给予米索前列醇 600 μg 口服，当日 16∶00 出现下腹部胀痛伴少量阴道流血，16∶40 自觉阴道内及肛周胀痛不适，再予妇检：阴道左前侧壁有约 5 cm× 8 cm 大小囊性包块向阴道内膨出，内诊右侧子宫如前。左侧子宫较前缩小，孕 50 d 大小，复查 B 超示：右子宫正常大小，无异常回声，左子宫稍大，宫内回声均质，孕囊下移至阴道左侧，考虑双阴道，一侧阴道中段闭锁可能，不排除残角子宫妊娠可能，故入院予急诊剖腹探查术。术中见左右两侧子宫各有一正常输卵管、卵巢，左侧子宫孕 50 d 大小，右侧子宫饱满，顺两宫体向下可扪及两宫颈，改截石位，台下医师上窥阴器暴露宫颈，台上医师扪左宫颈及其下方过程中，见左侧阴道壁平宫颈水平 2 点处，有一小水囊自一黄豆大小孔中突出。先行右侧子宫清宫术，清出少量蜕膜样组织，挤压阴道侧壁膨出部位，水囊渐变大，破水后流出完整绒毛组织，在台上医师帮助下吸头经左阴道壁小孔及左侧宫颈进入左宫腔行清宫术，术后诊断：① 双子宫，左侧子宫妊娠；② 左侧阴道中下段闭锁不全。

讨论

双子宫、双阴道、一侧阴道中下段闭锁不全为先天性生殖器官发育畸形。由于胚胎发育第 8～12 周时两侧副中肾管完全未融合所致，临床少见，B 超及详细的妇科检查是诊断此症的主要手段。该患者左侧阴道中隔上段有一位置隐蔽小窦道与右阴道相通，左侧子宫能正常受精怀孕，但胚胎不能排出，并且无明显痛经，肛周坠胀等经血淤积症状。单纯左侧阴道闭锁不能解释，增加诊断难度，不能作出明确肯定的术前诊断，而行剖腹探查术，术中考虑患者无经血淤积症状，且能妊娠，而未做进一步的阴道整形处理，若当时考虑周全，作切除双阴道相隔的纵膈行整形，可以避免再次左子宫妊娠流产时的处理困难。当再次左侧子宫妊娠，足月妊娠时应行剖宫产及左输卵管结扎术。就本例而言，若能在术前明确诊断，应可避免剖腹探查术。

关键词：药物流产；双子宫双阴道；阴道闭锁
中图法分类号：R714.21 文献标识码：B

参考文献：

[1] 杨 芳，张迎光. 双子宫双阴道并单侧处女膜闭锁一例[J]. 现代医用影像学，2000，3(6)：21—22.
[2] 乐 杰 主编. 妇产科学[M]. 北京：人民卫生出版社，2001. 397—399.
[3] 成令忠 主编. 组织与胚胎学[M]. 北京：人民卫生出版社，1990. 286—290.

（编辑 陈聪连）

作者简介：周 莉(1972—)，女，四川省南充市人，医师，主要从事妇产科的临床、科研及教学方面的研究。电话：(023)67727092

收稿日期：2001-11-06；修回日期：2002-02-03

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