

位于同一分支,亲缘关系很近.从比对和进化分析结果进一步确认该虫为短颈剑线虫 *X. brevicollum*.

②喜马拉雅剑线虫 D2D3 区分子生物学特征:喜马拉雅剑线虫 D2D3 区扩增 831 bp 的片段(GenBank 登录序列号:JN091972).在系统进化树(图 3)中,与 *X. brevicollum*、*X. taylari* 亲缘关系较近,与 Ahmad 等^[4]描述的近似种吻合.

3 讨论

短颈剑线虫和喜马拉雅剑线虫都属于美洲剑线虫组 *Xiphinema americanum* group,由于美洲剑线虫组内部分种间的差异非常小,甚至交叉重叠,rDNA 序列的相似性很高,美洲剑线虫组的有效种数量存在争议,如 Lamberti 等^[10]认为有 49 个有效种, Luc 等^[9]认为有 34 个有效种.本文对 *X. diffusum* 和 *X. brevicollum* 线虫进行形态比较及 rDNA 序列分析,两者形态特征及测量值重叠,在 ITS 系统发育树中两者处于同一分支,说明这 2 种线虫属于同一种线虫,与 Luc 等^[9]认为 *X. diffusum* 是 *X. brevicollum* 的同物异名结论吻合.

基于 rDNA-ITS、D2D3 序列构建的系统发育树,与 Lazarova 等^[11]基于 rDNA-18S 和 mtDNA 序列、Lamberti 等^[12]基于形态特征建立的系统发育树的拓扑结构基本类似.基于 rDNA 序列构建的系统发育树不仅从一定水平上揭示了剑线虫属内种群间的亲缘关系,也从另外一个角度支持了目前的形态分类观点,rDNA 序列可以作为剑线虫种类鉴定和进化分析的良好指标.

短颈剑线虫于 2011 年在日本报道^[13].本文首次报道了喜马拉雅剑线虫在日本分布,并公布了这 2 种线虫 ITS、D2D3 序列.

短颈剑线虫和喜马拉雅剑线虫为国家质量监督检验检疫总局首次截获.目前短颈剑线虫只在我国的江苏、浙江、湖南、广西等省区局部分布^[14].喜马拉雅剑线虫在我国没有分布记载.所以,应加强进境植物的审批和监管,以保护我国农林业生产的安全.

致谢:短颈剑线虫标本经浙江大学郑经武教授的复核,在此深表谢意!

参考文献:

[1] KRUGER J C, HEYNS J. A study of *Xiphinema brevicolle* sensu Heyns, 1974 (Nematoda) [J]. Phytophylactic,

1986,18:209-215.
[2] FRITZSCHE R, KEGLER H. Nematoden als vektoren von virus-krankheiten der obstgewachse[J]. TagBer dt Akad Lander Wiss Berl,1968,97:289-295.
[3] TRUDGILL D L, BROWN D J F, MCNAMARA D G. Methods and criteria for assessing the transmission of plant viruses by Longidorid nematodes [J]. Revue Nematol, 1983,6:133-144.
[4] AHMAD M, LAMBERTI F, RAWAT V S, et al. Two new species within the *Xiphinema americanum* group (Nematoda, Dorylaimida) from Garhwal Himalayas, India [J]. Nematol Medit, 1998, 26: 131-138.
[5] BRODIE B B. Potato [M] // BARKER K R, PEDERSON G A, WINDHAM G L. Plant and nematoche interactions. Wisconsin: American of Agronomy, 1998:567-594.
[6] VAIN T C. Restriction fragment length polymorphism separates species of the *Xiphinema americanum* group [J]. Journal of Nematology, 1993,25(3):361-364.
[7] SUBBOTIN S A, STURHAN D, CHIZHOV V N, et al. Phylogenetic analysis of Tylenchida Thorne, 1949 as inferred from D2 and D3 expansion fragments of the 28S rRNA gene sequences [J]. Nematology, 2006,8:455-474.
[8] LAMBERTI F, BLEVE-ZACHEO T. Studies on *Xiphinema americanum* sensu lato with description of fifteen new species (Nematoda, Longidoridae) [J]. Nematol Medit, 1979,7:51-106.
[9] LUC M, COOMANS A, LOOF P A A. The *Xiphinema amerianum* group (Nematoda: Longidoridae): II: Observation on *Xiphinema brevicollum* Lorfello da Costa, 1961 and comments on the group [J]. Fundam Appl Nematol, 1998,21:475-490.
[10] LAMBERTI F, HOCKLAND S, AGOSTINELLI A, et al. The *Xiphinema americanum* group: III: Keys to species identification [J]. Nematol Medit, 2004,32:53-56.
[11] LAZAROVA S S, MALLOCH G, OLIVEIRA C M G, et al. Ribosomal and mitochondrial DNA analyses of *Xiphinema americanum* group populations [J]. Journal of Nematology, 2006, 38(4):404-410.
[12] LAMBERTI F, MOLINARI S, MOEN M, et al. The *Xiphinema americanum* group: II: Morphometric relationships [J]. Russian Journal of Nematology, 2002,10(2):99-112.
[13] SAKAI H, TAKEDA A, MIZUKUBO T. First report of *Xiphinema brevicolle* Lordello et Costa, 1961 (Nematoda, Longidoridae) in Japan [J]. Zookeys, 2011,135: 21-40.
[14] 徐建华,傅鹏,程瑚瑞. 中国七省(区)剑属线虫的分类学研究 [J]. 南京农业大学学报, 1995,18(1):37-42.

【责任编辑 周志红】

人防御素 hβD-3 基因在大肠埃希菌中的融合表达

孔 杰, 曾 珍, 吴志伟, 褚 梦, 赵亚华
(华南农业大学 生命科学院, 广东 广州 510642)

摘要:研究了人类防御素 hβD-3 基因在大肠埃希菌细胞中的融合表达,采用 pET-32a(+)载体在 BL21(DE3)溶原菌中进行了 F-βD-3 蛋白的融合表达.结果表明,F-βD-3 蛋白的表达量达到 127.23 μg/mL,融合蛋白经镍柱亲和层析与肠激酶酶切后,最终得到 hβD-3 蛋白的量为 18.17 μg/mL.经对大肠埃希菌 K₁₂D₃₁的抑菌试验鉴定,肠激酶酶切后产物为有抑菌活性的重组 hβD-3 蛋白.

关键词:人 β 防御素 3; 融合基因表达; 镍柱亲和层析
中图分类号:Q786 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2012)04-0493-05

Fusion Expression of Human Defensin hβD-3 Gene in *Escherichia coli*

KONG Jie, ZENG Zhen, WU Zhi-wei, CHU Meng, ZHAO Ya-hua
(College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The fusion expression strategy of human beta defensin 3 (hβD-3) gene in *Escherichia coli* cells in the fusion expression by pET-32a(+) vector was studied. Fusion expression of F-βD-3 protein was performed in lysogenic bacterium BL21(DE3) by pET-32a(+) vector. The results showed that the production of F-βD-3 protein was 127.23 μg/mL. After nickel column chromatography and enterokinase cleavage, the fusion protein production finally obtained was 18.17 μg/mL. Recombinant hβD-3 protein products were identified to possess inhibitory activity by bacteriostatic test on *E. coli* K₁₂D₃₁.

Key words: human beta defensin 3; fusion gene expression; nickel affinity chromatography column

防御素(Defensins)是富含半胱氨酸的阳离子多肽,属于抗微生物多肽的一族.在体内,防御素能够通过结构性表达和诱导表达分别参与非特异性免疫和特异性免疫反应.防御素抗菌机制多样化,它可以通过膜的去极化作用和在膜上形成物理孔洞等多种方式改变细胞膜的通透性^[1-2].根据前人的研究,目前,防御素分为α、β和θ3类^[3].人防御素只有α和β2种,人β防御素3(Human beta defensin 3, hβD-3)具有广谱的抗菌活性,对多种病原体和一些有耐药性的微生物都有相当的抗性^[4-6].防御素具有广泛的抗菌谱,较高的抗菌活性,且免疫原性较低,不易

产生抗药性等诸多优点,从而使其具有广阔的药用前景.然而,从天然组织中获取防御素的难度很大,数量也很有限.用化学方法合成的成本很高,且价格昂贵,难以满足人类的需求.本研究拟以hβD-3为研究对象,设计了在大肠埃希菌中,采用pET-32a(+)载体以融合的方式表达hβD-3基因.利用载体上的Trx标签,以期增加所要表达的目的蛋白hβD-3的可溶性.pET-32a(+)载体上带有的His标签可以用于镍离子亲和层析^[7],其特异性强,能有效地分离目的蛋白与其他杂蛋白^[8-9].最后利用载体上附有的肠激酶的酶切位点,在完成表达后对融合蛋白进行切割,

收稿日期:2012-03-01
作者简介:孔 杰(1984—),男,博士研究生;通信作者:赵亚华(1955—),女,教授,博士,E-mail:zhaoyahua@126.com
基金项目:国家自然科学基金(30770317);广东省农业科学院兽医研究所开放基金(2012 年)

从而获得有活性的目的蛋白^[10]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及载体 表达质粒 pET-32a(+)、克隆菌株 *Escherichia coli* DH5 α 、表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3)均购自英韦创津生物科技公司,抗菌活性检测菌株 *E. coli* K₁₂D₃₁购自中国科学院广东省微生物研究所菌种室,并由华南农业大学生命科学学院生物化学研究室保存。

1.1.2 主要仪器 DYY-5 型稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂)、5810R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf)、5415D 型高速离心机(德国 Eppendorf)、DG-3A 微型水平电泳槽(北京鼎国生物技术的发展中心)、Gene Pulser Xcell 电转仪(Bio-Rad 公司)、WFJ 7200 型可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司)、LRH-150 型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)、THZ-C 恒温振荡器(江苏太仓试验设备厂)、PTC100 PCR 扩增仪(美国)。

1.1.3 主要试剂 基因工程分子操作用酶:*Nde* I、*Nco* I、*Taq* 酶、T₄ DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司,重组肠激酶(Recombined enterokinase)购自 Novagen 公司。dNTPs、DL2000 DNA marker、琼脂糖、RnaseA 购自北京鼎国生物技术的发展中心,Tryptone、Yeast Extract 为 Oxid 公司产品,质粒小量抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自 TianGen 公司。PCR 引物由广州英骏生物有限公司合成,PVDF Membrane Filter Paper Sandwich 和 ProBond Purification System 均购自 Invitrogen 公司。其余常用试剂均为进口或国产分析纯。

1.1.4 引物 根据 NCBI 上查得 h β D-3 多肽序列并推绎设计出 h β D-3 全基因的核苷酸序列,再根据 h β D-3 全基因序列设计引物:P I-1, 5'-ATCATATGGGTATCATCATCAACATCTTCAGAAATACTACTGCCGTGTTCTGTTGG-3'; P I-2, 5'-GGCACAAGCAC-CACCAGCAACGCGACAAGACTCGACGGACGGCTTTCTTCTTG-TG-3'; P I-3, 5'-CCGAAAGAAGAAGAA-CAGATCGGTAAATGCAGCACTCGTGCTCGTAAATGCTGCCGTC-3'; P I-4, 5'-CATTTACGACGGCAGCAT-TCTTCACTTCCTCCGGTACCCG-3'。预期扩增 h β D-3,同时,根据 pET 载体中的 T7 启动子序列,设计了用于检测外源基因是否重组进入 pET-32a(+)的检测引物 I:5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'。

1.2 方法

1.2.1 h β D-3 基因片段的扩增 h β D-3 基因扩增按

PCR 试剂盒说明书操作。PCR 扩增条件为:94 ℃ 变性 2 min;按 94 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s 共进行 25 个循环,最后 72 ℃ 延伸 2 min。用 20 g/L 琼脂糖电泳检测 PCR 结果。

1.2.2 重组载体 pET-32a(+)-h β D-3 的构建 取 pET-32a(+) 50 μ L,加入 1 μ L *Nde* I、1 μ L *Nco* I、8 μ L 10 $\times$ Buffer K、8 μ L 10 $\times$ BSA 和 12 μ L ddH₂O;再取 20 μ L 的 h β D-3PCR 产物,加入 1 μ L *Nde* I、1 μ L *Nco* I、4 μ L 10 $\times$ Buffer K、3 μ L 10 $\times$ BSA 和 11 μ L ddH₂O;都置于 37 ℃ 下酶切过夜后,加入 10 $\times$ Loading buffer 终止反应。取 PCR 管,按 1 μ L T₄ DNA 连接酶、1 μ L 10 $\times$ T₄DNA 连接酶缓冲液、2 μ L 酶切回收 pET-32a(+),1 μ L 酶切回收 h β D-3 和 5 μ L ddH₂O 的配制连接反应体系,混匀,16 ℃ 放置过夜,将重组子转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞。挑取白色菌落接种于 3 mL 含氨苄西林(Amp)的 LB 平板,37 ℃ 倒置培养 16 h。

1.2.3 转化子的菌落 PCR 鉴定 按以下配方,配制 PCR 反应液:检测引物 I (20 μ mol/L) 1 μ L、h β D-3 1 μ L、*rTaq* (5 U/ μ L) 0.25 μ L、10 $\times$ PCR buffer 1.5 μ L、dNTP mix 1 μ L。用灭菌吸头在固体 LB 平板上挑取 pET-32a(+) 与 h β D-3 基因的连接产物转化子,在含 0.1 mg/mL Amp 的 LB 平板点一下,保种并编号,然后浸泡于 PCR 反应液中并混匀。94 ℃ 变性 2 min,按 94 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s 共进行 25 个循环,最后 72 ℃ 延伸 2 min。反应完毕后取 5 μ L 进行电泳检测,PCR 结果阳性菌落委托广州英骏生物公司进行序列测定。

1.2.4 pET-32a(+)-h β D-3 融合蛋白的诱导表达 取出在 -80 ℃ 下冻存的大肠埃希菌表达菌种,接种于 4 mL 含 0.1 mg/mL Amp 的 LB 培养基,37 ℃ 振荡培养 8 h,作为种子液。取 250 mL 三角瓶,将 50 μ L 种子液接种于 50 mL 含 0.1 mg/mL Amp 的 LB 培养基中,在 37 ℃ 下振荡培养至 $D_{600\text{ nm}} = 0.5 \sim 0.6$ 。培养得到的培养液分装于 2 个 100 mL 三角瓶,每瓶 25 mL。其中一瓶加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG),另一瓶不加 IPTG,同时置于 30 ℃ 振荡培养 5 h。诱导完毕后,各取 1 mL 培养液,4 000 r/min 离心 5 min,取沉淀,加入 100 μ L 0.1 mol/L pH7.4 的 PBS 缓冲溶液重悬,超声波破碎细胞,然后 12 000 r/min 离心 15 min,分别取上清(可溶性蛋白部分)及沉淀(不溶性蛋白部分)50 μ L,加入 5 $\times$ SDS loading buffer,沸水浴 10 min,各取 10 μ L 进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。将剩余

的培养液于4℃ 4 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,用 ddH₂O 洗沉淀 2 次,4℃ 4000 r/min 离心 10 min,去上清,沉淀用 8 mL Native Binding buffer (含 10 mmol/L 咪唑)重悬,然后在冰浴下超声波破碎细胞(工作时间 10 s,间隔时间 20 s,总工作时间 30 min,功率 400 W).4℃ 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液于 4℃ 下保存备用.

1.2.5 pET-32a(+) -hβD-3 融合蛋白的镍离子亲和层析 按照镍离子亲和层析系统说明书装填层析柱,处理层析树脂,将上清液注入层析柱,温和振荡 1 h,静置层析柱,待树脂沉淀后吸出上清液,同时收集 100 μL SDS-PAGE 检测.在吸去上清后的层析柱中加入 8 mL Native wash buffer,振荡清洗树脂 3 次,每次 10 min,待树脂沉淀后吸出上清液,收集上清液 100 μL 用于 SDS-PAGE 检测.最后加入 Native elution buffer(含 400 mmol/L 咪唑)5 mL,温和振荡 30 min 洗脱.打开柱塞,使洗脱液流出,流速控制在 0.5 mL/min,同样收集 100 μL 用于 SDS-PAGE 检测,其余洗脱液于 4℃ 保存备用.

1.2.6 pET-32a(+) -hβD-3 融合蛋白的肠激酶酶切 将获得的吸附有 pET-32a(+) -hβD-3 融合蛋白的层析树脂用 5 mL 1×rEK clearance buffer 洗涤 3 次.打开柱塞,让洗涤液流出.加入 1 mL 1×rEK clearance buffer,然后按照一个酶活力单位为 50 μg 蛋白的比例加入 rEK,24℃ 下振荡反应 15 h,加入终质量浓度为 1 mg/L 的苯甲基磺酰氟(PMSF)终止反应.离心,上清液即为 pET-32a(+) -hβD-3 融合蛋白溶液.离心后的层析树脂加入 1 mL Native elution buffer(含 400 mmol/L 咪唑)温和振荡 30min 洗脱蛋白,静止 30 min,上清即为酶切后的洗脱液.取 pET-32a(+) -hβD-3 融合蛋白溶液和酶切后洗脱液各 20 μL,加入 5 μL 5×SDS loading buffer,沸水浴 10 min,进行 Tricine-SDS-PAGE,检测 rEK 酶切情况.

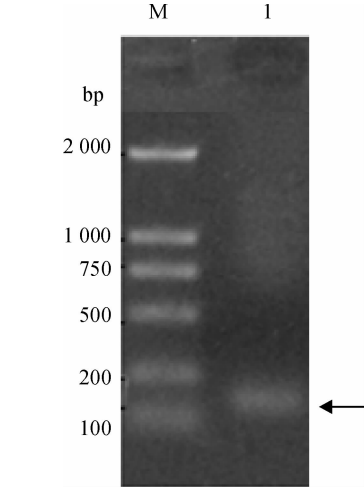
2 结果与分析

2.1 hβD-3 基因的合成及扩增

采用 PCR 的方法合成 hβD-3 全基因,经过 PCR 合成与扩增后,扩增片段大小位于 150 bp 左右,与目的片段 151 bp 的大小相符.结果如图 1.

2.2 pET-32a(+) 载体的酶切鉴定

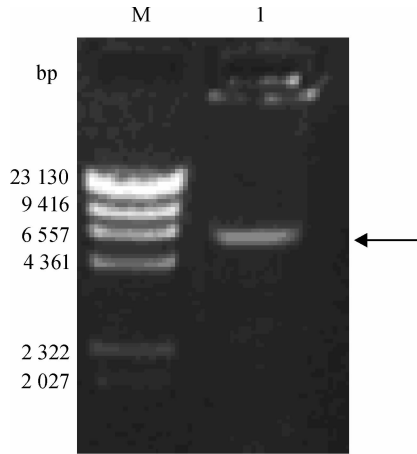
图 2 中泳道 1 中的电泳条带大小约在 Hind-III Marker 的 4 361 bp 与 6 557 bp 之间.与质粒 pET-32a(+) 的理论值大小 5 900 bp 基本相符,且只有一条泳带,证明双酶切是完全的,该电泳条带是 pET-32a(+).



M: DNA marker DL 2000; 1: 合成产物 hβD-3.

图 1 hβD-3 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Results of hβD-3 gene of PCR amplification



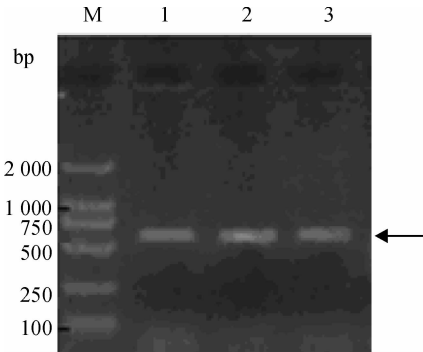
M: Hind-III marker; 1: 酶切后的 pET-32a(+).

图 2 pET-32a(+) 质粒双酶切分析图

Fig. 2 Double enzyme restriction analysis of pET-32a(+)

2.3 pET-32a(+) -hβD-3 重组子的 PCR 鉴定

酶切后的 hβD-3 基因与 pET-32a(+) 质粒经连接与转化后,挑取平板上转化后的单菌落,做菌落 PCR 鉴定,结果如图 3.



M: DNA marker DL2000; 1~3: pET-32a(+)-hβD-3 重组菌落 PCR 产物.

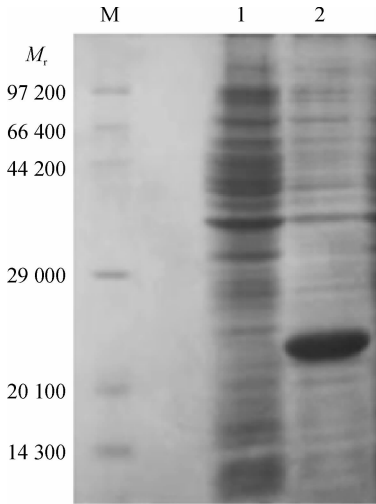
图 3 pET-32a(+) -hβD-3 菌落 PCR 鉴定

Fig. 3 Results of pET-32a(+)-hβD-3 recombinant of PCR

由图 3 可见,菌落 PCR 扩增出现 1 条约 700 bp 的电泳条带(如箭头所指).由于 PCR 鉴定采用 T7 Promoter 为 5'端引物,用 hβD-3 的 3'末端为 3'端引物,由此扩增出来的目的片段大小为 714 bp,这与 PCR 检测的结果相符.

2.4 hβD3 基因表达的融合蛋白的表达

hβD3 基因表达的融合蛋白(F-βD-3)经 IPTG 诱导后,进行 SDS-PAGE 检测,结果如图 4.



M:蛋白质 Marker;1:对照;2:诱导表达后的总蛋白.

图 4 F-βD-3 融合蛋白诱导表达的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of fusion protein F-βD-3 expression induction

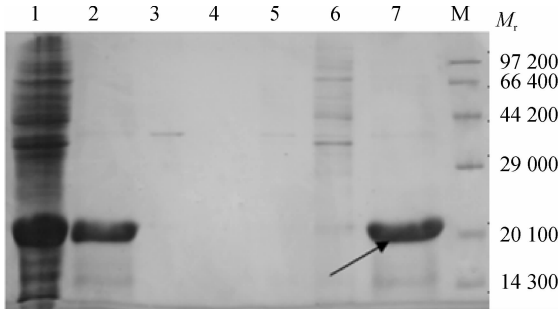
由图 4 可见,与未加 IPTG 诱导的对照相比,用 1 mmol/L IPTG 在 30 ℃诱导表达后的总蛋白在相应位置出现明显的诱导蛋白条带.经计算,F-βD-3 蛋白的相对分子质量为 5 100,加上载体上的附加序列约 17 200,融合蛋白 F-βD-3 的 M_r 理论值为 22 300, SDS-PAGE 的结果与该融合蛋白的理论相对分子质量基本相符.应用凝胶分析软件 Bandscan 5.0 分析诱导表达后总蛋白中融合蛋白的含量,F-βD-3 蛋白的表达量为 57.8%.用考马斯亮蓝 G250 法测定菌体总蛋白的质量浓度为 220.12 μg/mL,计算得到融合蛋白 F-βD-3 的表达量为 127.23 μg/mL.

2.5 F-βD-3 融合蛋白的镍柱亲和层析

F-βD-3 融合蛋白经过镍离子亲和层析后,各组分的 SDS-PAGE 电泳图如图 5.

由图 5 可见,经过镍离子柱亲和层析吸附之后的溶液中不含 F-βD-3 融合蛋白,说明 F-βD-3 融合蛋白基本上被 Ni 柱亲和层析树脂所吸附.从洗涤液的电泳结果可以看到,用含有 20 mmol/L 咪唑的 Native washing buffer 洗涤杂蛋白,没有 F-βD-3 融合蛋白被洗脱.从洗脱液的电泳结果可见,F-βD-3 融合蛋白可被含 400 mmol/L 咪唑的 Native elution buffer 洗脱下来,洗脱液中基本不含杂蛋白.经考马斯亮蓝

G250 法测定层析后溶液的总蛋白质量浓度为 46.72 μg/mL.



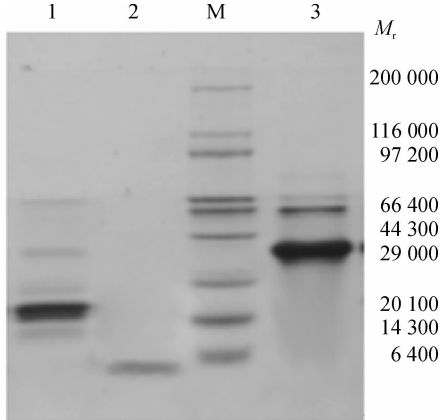
M:蛋白质 Marker;1:总蛋白;2、7:洗脱液;3~5:洗涤液;6:结合液.

图 5 F-βD-3 融合蛋白 Ni 亲和层析后各组分的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of Ni affinity chromatography of fusion protein F-βD-3

2.6 F-βD-3 融合蛋白的肠激酶酶切

F-βD-3 融合蛋白用肠激酶酶切后的 Tricine-SDS-PAGE 结果如图 6.



M:蛋白质 Marker;1:Trx 标签蛋白;2:rEK 酶切后蛋白;3:rEK 酶切前蛋白.

图 6 F-βD-3 融合蛋白的 rEK 酶切

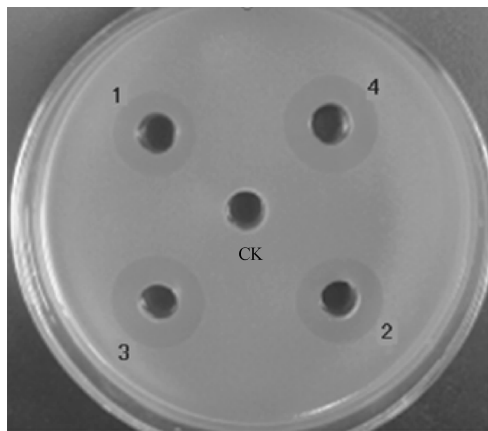
Fig. 6 Results of rEK restriction of fusion protein F-βD-3

由图 6 可见,被 rEK 酶切后的 F-βD-3 融合蛋白出现一条相对分子质量约为 5 000 左右的蛋白带,与 hβD-3 蛋白的相对分子质量基本相符,确认是从 F-βD-3 融合蛋白中切下的 hβD-3.另外在相对分子质量为 14 400 处出现 1 条新的条带,为载体上附带的 Trx 融合蛋白标签.经考马斯亮蓝 G250 法测定酶切后的总蛋白质量浓度为 18.17 μg/mL,可以认为该蛋白的质量浓度是最终得到的 hβD-3 蛋白量.经镍离子柱亲和层析与肠激酶切割融合标签后,目的蛋白 hβD-3 损失较大.

2.7 重组 hβD-3 蛋白的抑菌活性鉴定

取经肠激酶酶切的重组蛋白 hβD-3,用琼脂糖扩散法进行抑菌试验,以无菌水为对照,检测并比较重组蛋白 hβD-3 对大肠埃希菌 K₁₂D₃₁ 的抑菌活性,琼

脂糖扩散法抑菌测试结果如图7。由图7可见,融合表达的 F- β D-3 蛋白切割后的产物 h β D-3 蛋白对大肠埃希菌 K₁₂D₃₁ 均表现出明显抗性。编号1中 50 μ L h β D-3 蛋白抑菌圈直径为 15.1 mm,编号2中 55 μ L h β D-3 蛋白抑菌圈直径为 15.4 mm,编号3中 60 μ L h β D-3 蛋白抑菌圈直径为 16.3 mm,编号4中 65 μ L h β D-3 蛋白抑菌圈直径为 17.4 mm。随着 h β D-3 蛋白质含量增加,抑菌性也明显增强。



CK: 无菌水对照;1: 50 μ L h β D-3;2: 55 μ L h β D-3;3: 60 μ L h β D-3;4: 65 μ L h β D-3。

图7 不同体积 h β D-3 蛋白抑菌圈比较

Fig. 7 Comparison of different volumes of h β D-3 proteins

3 讨论

人 β 防御素类抗菌肽作用机制独特,不易使微生物产生耐药性,并且因其源于机体本身而具有非常高的安全性,因此研究开发这类抗菌肽对于解决细菌耐药问题具有重要意义^[11]。为了尝试有效的人 β 防御素 3 基因的融合表达路线,使 h β D-3 基因能够稳定、高效地表达,本研究构建了重组的 h β D-3 的融合基因表达载体 pET-32a(+)-h β D-3。pET-32a(+)载体在紧邻启动子的下游位置,包含有溶解性高,且能促进二硫键正确折叠的多肽序列融合标签(如 Trx · Tag),纯化标签(如 His · Tag),这些标签都能够促进外源基因的有效表达^[12-13]。研究中融合表达使用的载体为 pET-32a(+),载体带有 His · Tag,可以简便地用于镍离子亲和层析,而且特异性强,简化了下游纯化步骤。此外,载体提供的肠激酶酶切位点,使完成亲和层析后的蛋白能用肠激酶将融合片段完全切除。应用 pET-32a(+)载体在 BL21(DE3) 溶原菌中进行了 F- β D-3 蛋白的融合表达,表达量达到 127.23 μ g/mL。融合蛋白经镍柱亲和层析^[13]与肠激酶酶切后,有一定损失,最终得到 h β D-3 蛋白的量为 18.17 μ g/mL。对大肠埃希菌 K₁₂D₃₁ 的抑菌试验鉴定表明,h β D-3 蛋白均为有活性的重组蛋白,且随着 h β D-3 蛋白质含量的增加,抑菌的效果更加明显。

参考文献:

- [1] HUANG H W. Action of antimicrobial peptides: Two-state-model[J]. *Biochemistry*, 2000, 39(29): 8347-8352.
- [2] CHEN Yu-xin, MANT C T, FARMER S W. Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index [J]. *Biol Chem*, 2005, 280(13): 12316-12329.
- [3] DHOPE V, KRUKEMEYER A, RAMAMOORTHY A. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1758(9): 1499-1512.
- [4] WU Zhi-bin, HOOVER D M, YANG De, et al. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(15): 8880-8885.
- [5] SHELburne C E, COULTER W A, OLGUIN D, et al. Induction of β -defensin resistance in the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(1): 183-187.
- [6] JOLY S, ORGAN C C, JOHNSON G K, et al. Correlation between β -defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes [J]. *Mol Immunol*, 2005, 42(9): 1073-1084.
- [7] 徐伟, 林陈水, 杨文花, 等. 人防御素 HNP-1 在大肠杆菌中的融合表达及可溶性研究[J]. *浙江工业大学学报*, 2008, 36(3): 272-275.
- [8] HUANG Lei, WANG Ju-fang, ZHONG Zhi-xia, et al. Production of bioactive human β -defensin-3 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression [J]. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(9): 627-632.
- [9] HUANG Lei, CHING Chi-bun, JIANG Rong-rong, et al. Production of bioactive human beta-defensin 5 and 6 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression [J]. *Protein Expr and Purif*, 2008, 61(2): 168-174.
- [10] 陈珊, 何凤田, 董燕麟, 等. 人 β 防御素 3 融合蛋白在大肠杆菌中的表达、纯化与活性分析 [J]. *生物工程学报*, 2004, 20(4): 489-495.
- [11] WIMLEY W C, SRLSTED M E, WHITE S H. Interactions between human defensins and lipid bilayers: Evidence for formation of multimeric pores [J]. *Protein Sci*, 1994, 3(9): 1362-1373.
- [12] CHEN Hai-qin, XU Zhi-nan, XU Nai-zheng, et al. Efficient production of a soluble fusion protein containing human beta-defensin-2 in *E. coli* cell-free system [J]. *J Biotechnol*, 2005, 115(3): 307-315.
- [13] XU Zhi-nan, ZHONG Zhi-xia, HUANG Lei, et al. High-level production of bioactive human beta-defensin-4 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2006, 72(3): 471-479.