

日本鳗鲡 I 型 Cathelicidin 基因的克隆与原核表达

张东玲¹ 喻达辉²

(1. 集美大学水产学院 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 厦门 361021 ; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州 510300)

摘要: Cathelicidin 是目前发现的一个最大抗菌肽家族, 具有多重生物学功能。旨在探索和利用鱼类 Cathelicidin 抗菌机制和潜在的生物学功能。应用 RACE-PCR 技术获得日本鳗鲡 I 型 Cathelicidin (AjCathI) 基因的 cDNA 全长序列。AjCathI 的 cDNA 全长为 842 bp, 开放阅读框为 570 bp, 编码 189 个氨基酸。氨基酸序列分析表明, AjCathI 靠近 C 端有 4 个保守的半胱氨酸序列, 抗菌成熟肽与香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 抗菌成熟肽相似性最高, 同源性为 65.57%。进化分析表明, AjCathI 与其它鱼类亲缘关系较近, 处于同一个分支上。将 AjCathI 基因克隆至 pET-28a 载体, 转化 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 宿主菌进行表达。结果表明, AjCathI 以包涵体形式表达, 经镍柱纯化、Western blot 验证和透析复性, 获得高纯度的重组蛋白。

关键词: 日本鳗鲡 ; Cathelicidin ; 抗菌肽 ; RACE-PCR

DOI : 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2015.07.018

Cloning and Prokaryotic Expression of Cathelicidin Gene from Japanese Eel I, *Anguilla japonica*

Zhang Dongling¹ Yu Dahui²

(1. Fisheries College, Jimei University, Engineer Research Center of Eel Modern Industry Technology, Ministry of Education, Xiamen 361021 ; 2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300)

Abstract: Cathelicidin, an utmost family of antibacterial peptide so far, possesses multiple biological functions. In order to explore and exploit the antibacterial mechanism and potential biological functions of Cathelicidin, full-length sequence of cDNA of Cathelicidin gene from Japanese eel *Anguilla japonica* I (AjCathI) was obtained by RACE-PCR. The full cDNA of AjCathI was 842 bp and the ORF contained 570 bp encoding 189 amino acids. Analysis of amino acid sequence demonstrated that AjCathI contained 4 conservative cysteine residues at C terminal, and the mature antibacterial peptide had the highest similarity with *Plecoglossus altivelis* by homology of 65.57%. Phylogenetic analysis revealed that AjCathI shared a common evolutionary origin with other teleost fishes. AjCathI was cloned into pET-28a and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The result manifested that AjCathI protein was expressed in inclusion bodies. The protein was isolated by Ni column, identified by Western blot and re-natured by dialysis, the protein of high purity was gained. This study laid the foundation for further verifying mature peptide sequence of AjCathI and studying its antibacterial activities as well as other biological functions.

Key words: *Anguilla japonica* ; Cathelicidin ; antibacterial peptide ; RACE-PCR

抗菌肽又称宿主防御肽, 作为生物体非特异性免疫的一个重要组成部分, 是宿主防御细菌、病毒等病原生物体入侵的重要分子屏障, 广泛分布于动植物、昆虫和细菌等多种生物体内。Cathelicidin

是目前发现的一个最大抗菌肽家族, 不同的 Cathelicidin 前体肽结构相似, 包括 pro、pre 和 C 端成熟肽 3 个区域。Pro 区又称信号肽区, 引导小肽进入细胞内部 ; Pre 区为结构域, 包含一个高度保守

收稿日期 : 2014-10-22

基金项目 : 福建省教育厅重点项目 (JA13171), 集美大学李尚大学科建设基金项目 (ZC2013003), 集美大学鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心开放基金项目 (ZK2013005)

作者简介: 张东玲, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 水产动物免疫学 ; E-mail: donglingzhang@126.com

通讯作者: 喻达辉, 博士, 研究员, 研究方向: 水产生物技术与遗传育种 ; E-mail: pearlydh@163.com

的 cathelin 区, 4 个半胱氨酸靠近 C 端形成两个分子内二硫键, 直接影响到整个分子的结构; C 端成熟肽是一个高度变异的抗菌区域。Cathelicidin 在信号肽的引导下进入细胞内部, 然后切除 pro 区域, 剩下 C 端成熟肽发挥抗菌功能。迄今, 已陆续在盲鳗 (*Myxine eglutinosa*)^[1]、大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[2]、大西洋鲟 (*Gadus morhua*)^[3,4]、茴鱼 (*Thymallus thymallus*)^[5]、香鱼 (*Plecoglossus altivelis*)^[6] 等多种鱼类确认了 Cathelicidin 类抗菌肽的存在。但在鳎还未见该抗菌肽的报道, 因此, 有必要深入研究该抗菌肽的结构和功能。

我国是世界上主要鳎生产国之一, 在多年的养殖过程中, 病害发生较为频繁, 病原复杂, 其中以细菌性和寄生虫疾病最为严重^[7,8]。鳎人工养殖过程中多采用化学类药物, 如抗生素等, 导致细菌和寄生虫耐药性增强、水产品药残超标及对水环境污染, 这些均严重制约着我国鳎业的健康发展^[9]。抗菌肽的制备主要有天然材料提取、化学合成和基因工程表达 3 种方法, 但抗菌肽天然提取原料有限, 产量低, 提取过程又非常复杂。化学合成成本高, 价格昂贵, 不利于投入实际应用。因此, 借助成熟的基因工程技术获得抗菌肽, 开发药用价值, 是比较切实可行的方法。Cathelicidin 抗菌肽具有高效广谱的抗菌活性和不易产生耐药性等特点, 可在鱼病防治中起重要作用, 因此倍受关注。本研究克隆和原核表达纯化日本鳎 Cathelicidin, 以期为有效控制鳎细菌性疾病提供新途径, 同时也为鱼类抗菌肽的研究提供重要的参考价值。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司; pET-28a 载体、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、大肠杆菌 BL21 (DE3) 均由本实验保存。

1.1.2 主要试剂 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司; PVDF 膜为 Roche 公司产品; TRIZOL® Reagent Total RNA Isolation Reagent 购自 Invitrogen 公司; DAB 染色试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; 丙烯酰胺、N, N'-亚甲基双丙烯酰胺为 BBI 公司产品; 二硫苏糖 (DDT)、过硫酸铵、

TEMED 为 Amresco 公司产品; SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质 Marker、预染 Marker 购自 Fermentas 公司; 咪唑为 Sigma 公司产品; Western blot 一抗 (His-Tag 单抗) 为 Roche 公司产品; 二抗 (山羊抗鼠 IgG-AP) 购自上海捷瑞生物工程有限公司; 胰蛋白酶、酵母粉、氯化钙、氯化钠、无水乙醇、Trisbase、尿素、磷酸氢二钠等其它常用试剂均为国产分析纯。

1.1.3 实验动物 日本鳎: 购自集美大学海水养殖试验场, 体重约 300 g, 外观无明显病变和损伤。

1.2 方法

1.2.1 日本鳎 AjCathI 基因 cDNA 的克隆与序列分析 采用 Trizol 试剂盒并按照说明提取日本鳎肝脏总 RNA, 提取的总 RNA 用 1% 琼脂糖电泳检测完整性。

以 RNA 为模板, SMARTer IIA oligo 和 5'-RACE CDS Primer A 为反转录引物 (表 1), 采用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 反转录 cDNA。根据日本鳎的 AjCathI EST (GenBank : HS106475, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 设计引物扩增 AjCathI 基因 5' 端。以 cDNA 为模板, 5CR1 和 UPM 为引物第一轮 PCR 扩增, 反应程序为: 94 预变性 2 min; 94 变性 30 s, 65 退火 30 s, 72 延伸 2 min, 共 25 个循环; 最后 72 延伸 5 min。随后以第一轮 PCR 产物为模板, 5CR2 和 Nest 为引物第二轮 PCR 扩增, 反应程序为: 94 预变性 2 min; 94 变性 30 s, 70 退火 2 min, 5 个循环; 94 变性 30 s, 68 退火 30 s, 72 延伸 2 min, 25 个循环; 72 延伸 5 min。

用 DNA 胶回收试剂盒回收 AjCathI 基因的 PCR 产物, 连接于克隆载体 pMD18-T, 构建 pMD-AjCathI 质粒并转化至 DH5 α 感受态细胞, 经 PCR 阳性克隆鉴定后送 Invitrogen 公司测序。

1.2.2 日本鳎 AjCathI 原核表达载体的构建 根据已获得的日本鳎 AjCathI cDNA 序列及 pET-28a (+) 多克隆位点, 设计引物 CF 和 CR (表 1), 引物分别加入 Nco I 和 Xho I 酶切位点。以日本鳎 AjCathI (cDNA) 重组 pMD18-T 阳性质粒为扩增模板, 以 CF、CR 为上下游引物, 用 pfu 高保真 Taq 酶扩增目的片段。PCR 反应程序: 94 预变性 2 min; 94 变

表 1 AjCathI 克隆和原核表达的引物

名称	序列 (5'-3')	目的
5CR1	GTTTGCTGTCTGTTGCTGTGCGTT	5' RACE
5CR2	GGGTGCCACTGTCTCCCTTGCTC	
CF	GCGCCATGGCCAGCGTGGAGTGGAGTTAG	扩增表达序列
CR	GGGCTCGAG TGCAGTTCGGGTGCCACT	
SMARTer IIA oligo	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAAGTAC × × × ×	5' cDNA 合成
5'- RACE CDS Primer A	(T) ₂₅ VN	
10 × Universal Primer A Mix (UPM)	Long :CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAG TGGTATCAACGCAGAGT Short :CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE 通用引物
Nest primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	

性 30 s, 58 退火 30 s, 72 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 延伸 5 min。PCR 产物电泳回收纯化后, 经 Nco I 和 Xho I 双酶切后, 克隆于表达载体 pET-28a (+), 转化至 DH5 α 感受态细胞, 并利用卡那霉素抗性平板筛选阳性克隆, 经 PCR 阳性克隆鉴定后送 Invitrogen 公司测序。

1.2.3 重组蛋白诱导表达条件的优化与表达形式的鉴定 经测序准确后, 将携带目的基因的 pET-28a/AjCathI 的重组质粒转化入表达受体菌 BL21 (DE3)。挑取单克隆, 接种于 LB/KMN 培养基, 37、250 r/min 培养过夜, 次日按 1:100 的比例加入到新鲜的 LB/KMN 培养基中, 37, 250 r/min 剧烈震荡培养。分别进行诱导温度、诱导剂浓度、诱导时间和诱导菌起始生长量对重组蛋白表达量的影响。收集菌液, SDS-PAGE 蛋白电泳检测。同时设空载体, 未加 IPTG 的重组质粒作对照。

收集表达的菌体, 超声波破碎, 于 4, 4 000 \times g 离心 20 min, 分别收集上清和沉淀, 取样进行 SDS-PAGE 电泳检测, 鉴定重组蛋白表达的形式。

1.2.4 重组表达蛋白的纯化与 Western blot 鉴定 大量表达重组蛋白 AjCathI 2-3 L, 离心收集菌体。用预冷的裂解缓冲液悬浮菌体, 加入适当的蛋白酶抑制剂 PMSF。冰浴下超声破碎菌体至菌液较清无黏性 (功率 400-480 W, 破碎 5 s 间隔 10 s, 25 min)。4 000 \times g 离心 20 min, 收集沉淀, 再用 10 mL 0.5 mol/L 尿素, PBS 洗涤液各清洗一次, 4 000 \times g 离心 20 min 取沉淀。沉淀用结合缓冲液充分溶解后, 10 000 \times g 离心 10 min, 取上清用 0.45 μ m 滤膜过滤,

滤液经 AKTA-purifier 100 纯化系统, 金属镍螯合层析柱纯化。用 25 mL 洗脱缓冲液洗脱目标蛋白, 流速 1 mL/min, 检测波长 A₂₈₀。收集洗脱峰蛋白, 取少量 SDS-PAGE 电泳。

取纯化后的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 100 mA, 转移 1 h, 将蛋白印迹至 PVDF 膜上。1% 牛血清白蛋白/TBST 封闭液 1:6 000 稀释一抗 (His-Tag 单抗), 4 孵育过夜。1:10 000 稀释二抗 (山羊抗鼠 IgG-AP), 室温孵育 1 h。DAB 显色, 清水洗净, 观察结果。

1.2.5 重组表达蛋白的复性 采用透析法, 将洗脱缓冲液中的 8 mol/L 尿素逐步降低至 6、4、2 和 1 mol/L 透析重组表达蛋白, 最后用 PBS 溶液透析 1 次, 将目的蛋白溶液中的尿素完全去除。由于蛋白在变性状态时疏水残基暴露, 一般水溶性很差, 大多会形成可见的沉淀析出。复性后的蛋白溶解度增加, 但仍然会有一些没有复性成功的蛋白沉淀, 10 000 \times g 离心 10 min, 收集上清。同时取少量 SDS-PAGE 电泳检测复性后的重组蛋白是否发生断裂。

2 结果

2.1 日本鳎 AjCathI 基因 cDNA 的获得

应用特异性引物 5CR1、5CR2 和 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 提供的通用引物, 从日本鳎肝组织扩增出一条约 300 bp 大小的片段, 经纯化、连接、转化、质粒提取和阳性克隆鉴定, 得到阳性重组子并测序。结果得到一条包含 5' UTR 和一部分编码在内的 349 bp 的片段, 与日本

鳗鲡 AjCathI 3' Race 产物比对, 两者有一个 223 bp 的重叠区, 经过序列拼接和碱基校对最终得到 842 bp 全长的 AjCathI cDNA。AjCathI cDNA 序列由 69 bp 5' UTR、570 bp ORF 和 203 bp 3' UTR 三部分组

成, 编码 189 个氨基酸 (图 1)。经提交 GenBank 检索表明, 从日本鳗鲡肝脏分离得到的 AjCathI 基因属于新的 Cathelicidin 家族基因, GenBank 登录号为 AFP72291。

1	AGCTTGCATGCTGCAGGTGACGATTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGAT	60
61	GCTGAAACTatgaaaggctatcgtgaaatcgcactgctgactgctgactgaccgcttctgctggcc	120
1	M R A I V K S L L V A L T A L L A	17
121	actgctcagctggagtgagtttagctacgaagggtcatcgtagatgctgacaccaccgc	180
18	T A Q R G V E F S Y E G V I V D A T T R	37
181	tacgtacaacaggctggggaagaatacgccttcagaccgctgctgagagctctgcaagt	240
68	Y V Q Q A G E E Y A F R P L L R A L Q V	57
241	gaaactgttccactgctgaaatttgtagacaagccagtggtgctcaggaagctaacgttc	300
58	E T V S T A E F V D K P V V V R K L T F	77
301	cctctgcatgagactatctgtgaagcacaagcagaacagacaggcaaacagtgctccctta	360
78	P L H E T I C E R T D E Q T G K Q C P L	97
361	aaaaggaaatggaaatcatttatgtgcaacatggcgatttctcagccggtacttgtagagc	420
98	K R N G K S F M C N M A I S Q P V L E S	117
421	agtatacccagagcactggcatcacatgtgaaccatgaccacgaatcagctacagcat	480
118	S I P Q S T G I T C E P M T T N Q L Q H	137
481	aaagatccggatgagaagaagcaaggccggcaaaagttctggagggaacaaagggaataag	540
138	K I R M R R S K A G K G S G G N K G N K	157
541	ggctctggccgaaacaaagggaacaagggtctctgaccgggggtgggtccagcatgct	600
158	G S G G N K G N K G S R P G G G S S I A	177
601	ggcagagacaaggagacagtgccaccogaactgcaTAGAAGCAGAGAGAGGCATCACT	660
178	G R D K G D S G T R T A *	189
661	AATCAAGCCACCACGATTGGCACAATCTTGTGTTATTCGACAGTCCCAATCACTGAACTGC	720
721	ACCGITTCCTTTTAAATTTAGGTATGCACAGTAAAATCATATTTTGCACATTTTCTGAATT	780
781	GTACAAAACGATTGTGAAATAATACATTTCGTGTGATCTTAAAAA	840
841	AA 842	

大写字母代表 5' 和 3' UTR ; 小写字母代表编码区 ; 阴影部分代表编码的氨基酸序列 ; 阴影黑体字代表推导的成熟肽序列 ; 起始密码子 ATG 用方框标明 ; * 显示终止密码子 TAG ; 3' 非编码区的多腺苷酸化信号 AATAA 用斜体字标明 ; 信号肽用下划线标明

图 1 日本鳗鲡肝脏 AjCathI 全长 cDNA 及由此推导出的氨基酸序列

2.2 日本鳗鲡 AjCathI 基因与其他动物 Cathelicidin 基因编码的氨基酸同源性比对与序列分析

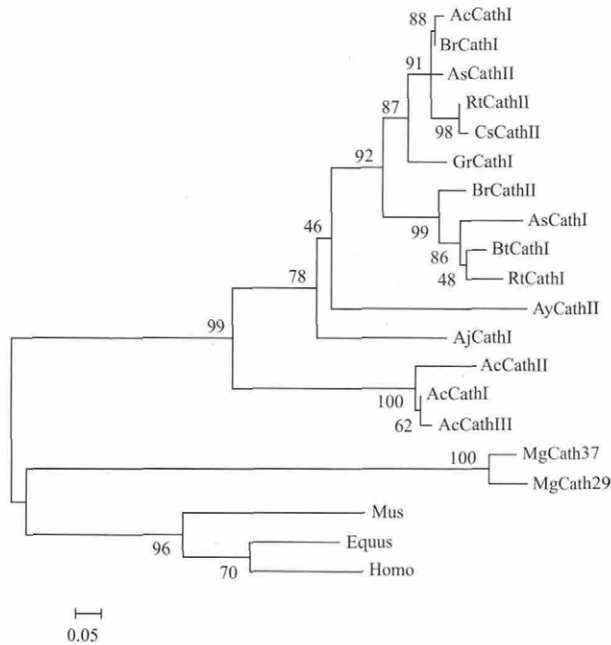
日本鳗鲡 AjCathI cDNA 推导的氨基酸序列与部分已分离到的或由核苷酸推导出的 Cathelicidin 序列比对, 显示 4 个半胱氨酸保守位点高度一致, 并且同一属的鱼类, Cathelicidin 在信号肽氨基酸的组成上基本一致。AjCathI 并不含有 Cathelin 保守区, 与其他动物 Cathelicidin 氨基酸同源性较低, 为 25%-53%。参考已报道源于嗜中性粒细胞弹性蛋白酶作用的位点, 推测 AjCathI 成熟肽为 50 个氨基酸 (图 1)。AjCathI 抗菌成熟肽与香鱼抗菌成熟肽相似性最高, 同源性为 65.57%。系统进化分析 (图 2) 表明, AjCathI 与鱼类亲缘关系较近, 与大西洋鲟 Cathelicidin 同源性最高, 处在同一个分支上。

2.3 日本鳗鲡 AjCathI 的原核表达

取单克隆阳性鉴定, 测序, 结果证明连接正确, 核苷酸的开放阅读框 (ORF) 编码连续, 并连有 6 个 His 标签, 最终获得正确构建的 pET-28a /AjCathI 表达载体。将 pET-28a /AjCathI 重组质粒转化至 BL21 (DE3), 诱导表达, 表达产物经 15% SDS-PAGE, 对凝胶染色、脱色后, 重组质粒和空质粒相比, 具有明显的表达蛋白带, 重组质粒表达蛋白分子量在 19.0 kD 左右, 与计算的理论分子量 19.575 kD 相似 (图 3)。

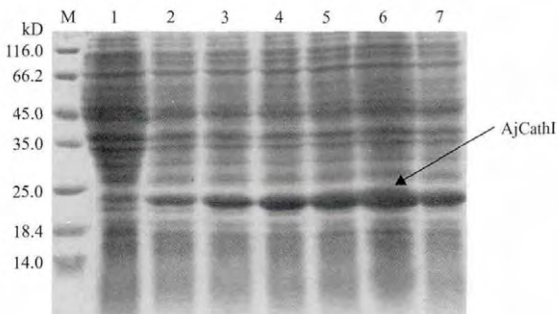
2.4 重组蛋白表达形式的鉴定

取表达菌体超声波破碎并离心后的上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 电泳结果 (图 4) 显示, 可见表达产物绝大部分以包涵体形式存在于菌体沉



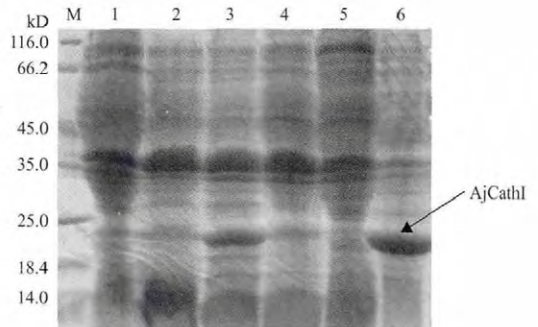
各序列 SwissProt 或者 GenBank 登录号为 : 北极红点鲑 AchCathI (*Salvelinus alpinus*, ACE96052), 美洲红点鲑 BrCathI 和 BrCathII (*S. fontinalis*, CAQ60111, CAQ60110), 大西洋鲑 AsCathI 和 ASCathII (*Salmo salar*, AAR13366, NP_001117045), 虹鳟 RtCathI 和 RtCathII (*Oncorhynchus mykiss*, AAT67998, AAR13365), 大鳞大马哈鱼 CsCathII (*O. tshawytscha*, ABW96220), 茴鱼 GrCathI (*Thymallus thymallus*, CAQ60112), 河鲈 BtCathI (*S. trutta fario*, ABW16872), 香鱼 AyCathII (*Plecoglossus altivelis*, CBV36822), 大西洋鳕鱼 ACCathI (*Gadus morhua*, 1ACE96051, 2ACE96051, 3ACE96051), 盲鳗 MgCath37 和 MgCath29 (*Myxine glutinosa*, AAQ04688, AAQ04687), 小鼠 (*Mus musculus*, EDL09033), 马 (*Equus caballus*, CAA12227), 人类 (*Homo sapiens*, EAW64854)。

图2 日本鳗鲡 AjCathI 氨基酸序列与其它已知 Cathelicidin 氨基酸序列系统进化树分析



M : 低分子量标准蛋白质 Marker ; 1 : pET-28a /AjCathI 重组质粒未诱导 ; 2-7 : 依次为 pET-28a /AjCathI 重组质粒在诱导时间为 3、4、5、6、7 和 8 h 的诱导表达蛋白

图3 pET-28a/AjCathI 重组质粒在不同诱导时间下的表达结果



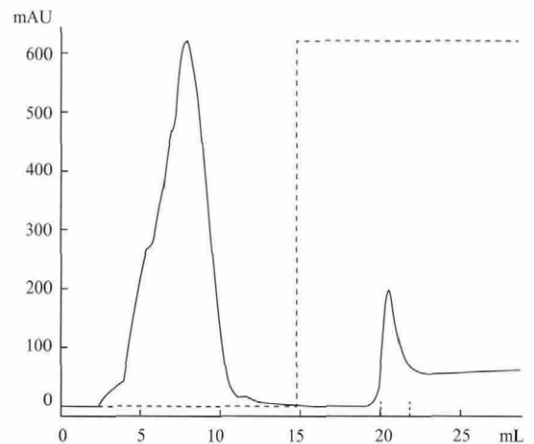
M : SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质 Marker ; 1 : pET-28a/AjCathI 未诱导菌体总蛋白 ; 2 : pET28a 空载体 42 诱导 7 h ; 3, 6 : pET-28a/AjCathI 诱导菌体超声波破碎后沉淀 ; 4, 5 : pET-28a/AjCathI 诱导菌体超声波破碎后上清

图4 重组表达 pET-28a/AjCathI 蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

淀中, 菌体上清中几乎没有可溶状态的表达产物存在。

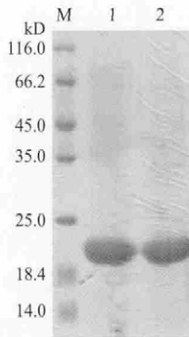
2.5 重组蛋白表达的纯化

为了得到 AjCathI 表达产物, 将超声破碎菌体收集的沉淀部分过镍离子螯合亲和层析柱, 用咪唑洗脱螯合的融合蛋白, 280 nm 检测紫外吸收曲线, 可见到明显的洗脱蛋白峰 (图 5)。收集洗脱部分进行 SDS-PAGE 电泳 (图 6), 两个蛋白洗脱峰中均含有目的蛋白 AjCathI。以 6-His-tag 单克隆抗体做 Western blot 鉴定纯化产物, 结果 (图 7) 显示为阳性条带。



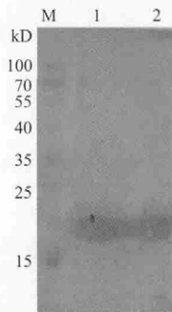
实线代表 A_{280nm} 紫外吸收曲线, 虚线代表咪唑浓度

图5 亲和层析柱 (IMAC) 纯化目的蛋白 AjCathI



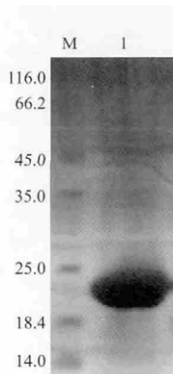
M : 低分子量标准蛋白质 Marker ; 1, 2 : IMAC 洗脱 AjCathI 蛋白

图 6 IMAC 洗脱蛋白电泳



M : 低分子量标准蛋白质预染 Marker ; 1, 2 : 硝酸纤维素杂交膜印迹

图 7 Western blot 鉴定 AjCathI



M : 低分子量标准蛋白质 Marker ; 1 : 复性后的重组蛋白

图 8 重组蛋白复性分析

2.6 重组蛋白的复性

通过黏度和浊度判断蛋白复性效果, 重组蛋白最终溶解于 PBS 溶液中, 呈现透明状态, 说明复性成功。SDS-PAGE 电泳 (图 8) 显示均有目的条带, 说明蛋白复性过程中基本没有发生降解和断裂。

3 讨论

Cathelicidin 根据成熟肽二级结构的不同分为以下四大类: 第一类是 α -螺旋结构 (如鼠的 CRAMP) [10]; 第二类是延伸螺旋结构 (如牛的 indolicidin) [11], 一般含有大量的脯氨酸 (13%-49%) 和精氨酸 (13%-33%); 第三类是环状结构 (如牛的 bactenecin) [12], 这一类分子由于含有一个二硫键而形成环状; 第四类是 β 折叠结构 (如猪的 protegrin1) [13], 这一类分子通常含有 2-3 个二硫键, 这些分类结构有利于抗菌肽与细菌细胞膜结合 [14]。抗菌肽预测工具 (http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php) 分析 AjCathI 成熟肽含有疏水性氨基酸残基蛋氨酸 1 个, 丙氨酸 2 个, 疏水性比例为 10%, 电荷为 +11。DNASTAR 软件分析, 结果显示整个成熟肽形成亲水性很强的区域, AjCathI 为亲水性强阳离子抗菌肽, 没有 α 螺旋结构, 形成延伸和任意卷曲的可能性比较大。Garnier 等 [15] 方法分析, AjCathI 形成延伸结构的比例为 18%, 任意卷曲的比例为 82%。Geourjon 等 [16] 方法分析, AjCathI 形成延伸结构的比例为 16%, 任意卷曲的比例为 84%。Frishman 等 [17] 方法分析, AjCathI 形成任意卷曲的可能性为 100%。该抗菌肽与以往的抗菌肽结构有一定的差异, 其是否在水溶液中形成任意卷曲结构, 而在与生物膜接触时形成 α 螺旋结构有待进一步考证, 因此抗菌作用机制还有待通过圆二色谱及定位圆二色谱法、固相核磁共振技术、中子衍射和 X-光散射等技术进一步研究。

目前, 用于原核表达系统的基因工程载体主要分为非融合表达载体和融合表达载体, 后者又以携带 6 \times His Tag 和谷胱甘肽转移酶标签 (GST Tag) 的载体应用最为广泛。本试验选用了高效融合表达载体 pET-28a, pET-28a 为含有 T7 强启动子的原核高效表达载体, 可将目的序列插入多克隆位点, 表达出目的蛋白, 同时载体携带有 6 个 His 标签, 便于后续的纯化。在实验中我们曾经尝试用 pGEX-4T-1 表达载体, 通过控制培养条件, 诸如 IPTG 浓度、培养温度和诱导时间等来增加蛋白的表达量, 但多次实验证明了 pGEX-4T-1 质粒无法表达重组蛋白。

诱导条件对重组蛋白的表达也有不同程度的影

响,如 IPTG 浓度、诱导时间、诱导温度、大肠杆菌起始浓度、培养基的组成、pH 和溶解氧等。王沛珍^[18]报道低温 16 ℃ 可以增加 thanatin 抗菌肽表达量和可溶性,同时诱导 9 h 为最佳诱导时间。Ramos 等^[19]报道将诱导温度从 37 ℃ 降到 30 ℃ 可以增加满月蛤 (*Lucina pectinata*) rHbII 的表达量。Ma 等^[20]报道在 YT 培养基中加入 0.5% (w/v) 的葡萄糖可以显著增加 adenoregulin 抗菌肽的表达量。本实验发现诱导温度和诱导时间对 Cathelicidin 蛋白的表达量有比较显著的影响。AjCathI 在温度为 42 ℃, 诱导时间为 7 h 蛋白表达量最高。

在原核表达过程中导致包涵体形成的原因有很多^[21-23]。本实验最终得到目的蛋白是以包涵体的形式存在,包涵体存在也有优点,如蛋白质表达量高,可避免宿主细胞蛋白酶对目的蛋白降解,包涵体易从宿主细胞中纯化,可避免毒性蛋白(如毒素蛋白)对宿主细胞的毒性等优势。洗脱目的蛋白的方法有两种,一种是降低 pH 洗脱,降低 pH 值可以减弱组氨酸和镍离子之间的作用力,从而对蛋白进行洗脱,降低 pH 值洗脱不会在洗脱的蛋白中带入高浓度的咪唑,但很可能引起目标蛋白在等电点附近的沉淀。另一种方法是升高咪唑的浓度,竞争目的蛋白与 Ni²⁺ 结合,从而洗脱蛋白。此方法简单易行,但同时洗脱的目的蛋白含有高浓度的咪唑。此外,也有用咪唑和降低 pH 值相结合的方法进行洗脱,Zhang 等^[24]先用 60 mmol/L pH8.0 的咪唑洗脱杂蛋白,再用 pH4.0 的缓冲液洗脱目的蛋白 hepcidin。本实验采用了一步咪唑洗脱方法,最终得到大量的 AjCathI 蛋白。包涵体复性的方法有很多,如稀释复性、透析复性、超滤复性、层析柱复性、温度跳跃式复性等。本实验采用了透析复性,最终灭菌水溶解冻干的蛋白澄清,说明复性成功,SDS-PAGE 电泳检测蛋白完整性很好。

LL-37 是人类唯一的 Cathelicidin 类抗菌肽,具有广谱的抗菌活性、化学趋化性及促进血管生成和伤口修复性等特点,致使许多学者采用不同的方法体外表达重组蛋白,包括采用 GST 和 pET 系列载体及不同的纯化方法。冯云等^[25]表达了 GST-FALL-39 (最开始推测的人类 Cathelicidin 成熟肽,其比 LL-37 多两个氨基酸)抗菌肽,GST-FALL-39 存在于菌体

裂解液的上清中,通过凝胶 4B 柱及 AU-PAGE 得到高纯度的蛋白。Moon 等^[26]应用与冯云等相似的方法表达出 GST-LL-37 融合蛋白,并发现低温 30 ℃, 及低 IPTG 浓度 (0.1 mmol/L) 可以显著增加可溶性重组蛋白的产量。Li 等^[27]应用 pET32a 载体也表达出可溶性的 LL-37 重组蛋白,应用亲和色谱和反相色谱去除硫氧还原蛋白及其它杂蛋白,得到含有 6 个 His-tag 的 LL-37 蛋白。鱼类 Cathelicidin 如同哺乳动物一样只有成熟肽部分具有抗菌活性。一些学者原核表达出 Cathelicidin prodomain,再用弹性蛋白酶酶解重组蛋白,确认出成熟肽序列。至今大西洋鳕鱼、虹鳟、香鱼 Cathelicidin 成熟肽已得到确认,成熟肽均具有较强的抗菌活性。

4 结论

本研究克隆并表达了日本鳗鲡抗菌肽 AjCathI。AjCathI 的 cDNA 全长为 842 bp,编码 189 个氨基酸。将 AjCathI 基因克隆至 pET-28a 载体,pET-28a/AjCathI 蛋白最佳表达条件为 42 ℃,诱导 7 h,并以包涵体形式存在。经镍柱纯化、Western blot 验证和透析复性,最终获得高纯度的重组蛋白。

参考文献

- [1] Uzzell T, Stolzenberg ED, Shinnar AE, et al. Hagfish intestinal antimicrobial peptides are ancient cathelicidin [J]. *Peptides*, 2003, 24 (11) : 1655-1667.
- [2] Chang CI, Zhang YA, Zou J, et al. Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Antimicrob Agents*, 2006, 50 (1) : 185-195.
- [3] Maier VH, Dorn KV, Gudmundsdottir BK, et al. Characterisation of cathelicidin gene family members in divergent fish species [J]. *Mol Immunol*, 2008, 45 (14) : 3723-3730.
- [4] Broekman DC, Frei DM, Gylfason GA, et al. Cod cathelicidin : Isolation of the mature peptide, cleavage site characterization and developmental expression [J]. *Dev Comp Immunol*, 2011, 35 (3) : 296-303.
- [5] Scocchi M, Pallavicini A, Salgaro R, et al. The salmonid cathelicidin : A gene family with highly varied C-terminal antimicrobial domains [J]. *Comp Biochem Physiol B*, 2009, 152 (4) : 376-381.
- [6] Lu XJ, Chen J, Huang ZA, et al. Identification and characterization

- of a novel cathelicidin from ayu, *Plecoglossus altivelis* [J] . *Fish Shell Immunol*, 2011 :31 (1) :52-57.
- [7] Arafa SZ, Reda ES. Surface features of the monogenean gill parasites *Pseudodactylogyrus anguillae* and *Pseudodactylogyrus bini* from the European eel *Anguilla anguilla* in Egypt [J] . *Parasitol Res*, 2012, 110 :127-133.
- [8] Cao HP, He S, Wei RP, et al. *Bacillus amyloliquefaciens*G1 :A potential antagonistic bacterium against eel-pathogenic *Aeromonas hydrophila* [J] . *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 82104 :1-7.
- [9] Bergwerff AA, Scherpenisse P. Determination of residues of malachite green in aquatic animals [J] . *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, 788 :351-359.
- [10] Chen K, Xiang Y, Huang J, et al. The formylpeptide receptor 2 (Fpr2) and its endogenous ligand cathelin-related antimicrobial peptide (CRAMP) promote dendritic cell maturation [J] . *J BiolChem*, 2014, 289 (25) :17553-17563.
- [11] Végh AG, Nagy K, Bálint Z, et al. Effect of antimicrobial peptide-amide :indolicidin on biological membranes [J] . *J Biomed Biotechnol*, 2011 :670589.
- [12] Lee JY, Yang ST, Kim HJ, et al. Different modes of antibiotic action of homodimeric and monomeric bactenecin, a cathelicidin-derived antibacterial peptide [J] . *BMB Rep*, 2009, 42 (9) :586-592.
- [13] Baumann A, Démoulin T, Python S, et al. Porcine cathelicidins efficiently complex and deliver nucleic acids to plasmacytoid dendritic cells and can thereby mediate bacteria-induced IFN- α responses [J] . *J Immunol*, 2014, 193 (1) :364-371.
- [14] Ramanathan B, Davis EG, Ross CR, et al. Cathelicidin : microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity [J] . *Microbes Infect*, 2002, 4 (3) :361-372.
- [15] Garnier J, Gibrat JF, Robson B. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence [J] . *Methods Enzymol*, 1996, 266 :540-553.
- [16] Geourjon C, Déleage G. SOPMA: Significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments [J] . *CABIOS*, 1995, 11 (6) :681-684.
- [17] Frishman D, Argos P. Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence [J] . *Protein Eng*, 1996, 9 (2) :133-142.
- [18] 王沛珍. Thanatin 的原核表达、纯化及其抗菌活性的检测 [D] . 广州 :南方医科大学, 2010.
- [19] Ramos C, Pietri R, Lorenzo W, et al. Recombinant hemoglobin II from *Lucina pectinata* :A large-scale method For hemeprotein expression in *E. coli* [J] . *Protein J*, 2010, 29 (2) :143-151.
- [20] Ma YS, Cao W, Zhou YX, et al. Expression and purification of antimicrobial peptide adenoregulin with C-amidated terminus in *Escherichia coli* [J] . *Protein Expr Purif*, 2005, 40 (2) :404-410.
- [21] Villaverde A, Carril M. Protein aggregation in recombinant bacteria :biological role of inclusion bodies [J] . *Biotechnol Lett*, 2003, 25 (17) :1385-1395.
- [22] Ventura S. Sequence determinants of protein aggregation :tools to increase protein solubility [J] . *Microb Cell Fact*, 2005, 4 (1) :11-18.
- [23] 王增, 马会勒, 张文, 等. 包涵体蛋白的分离和色谱法体外复性纯化研究进展 [J] . *中国生物工程杂志*, 2009, 29 (7) :102-107.
- [24] Zhang JJ, Yan QP, Ji RX, et al. Isolation and characterization of a hepcidin peptide from the head kidney of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* [J] . *Fish Shell Immunol*, 2009, 26 :864-870.
- [25] 冯云, 杨云霞, 黄宁, 等. 人抗菌肽 FALL-39 在大肠杆菌中高效表达 [J] . *生物医学工程杂志*, 2003, 20 (4) :634-637.
- [26] Moon JY, Henzler-Wildman KA, Ramamoorthy A. Expression and purification of a recombinant LL-37 from *Escherichia coli* [J] . *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1758 (9) :1351-1358.
- [27] Li Y, Li X, Wang G. Cloning, expression, isotope labeling, and purification of human antimicrobial peptide LL-37 in *Escherichia coli* for NMR studies [J] . *Protein Expr Purif*, 2006, 47 (2) :498-505.

(责任编辑 马鑫)