

人 β -防御素 3 基因的克隆及其在酿酒酵母中的表达

吴晖, 陈艺, 肖俊梅, 唐语谦

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 以质粒 pPIC9K-hBD3 为模板, 扩增得到一段上游带信号肽因子 (α -factor) 的人 β -防御素-3 (hBD-3) 基因, 克隆至酿酒酵母穿梭质粒 pYES2 中, 构建了酿酒酵母表达载体 pYES2- α -factor-hBD3 (pY α -hBD3)。将重组质粒转化至 *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1 中, 鉴定阳性重组子, 经 2% 半乳糖诱导表达。实验发现表达所得 hBD-3 对金黄色葡萄球菌 (ATCC6538) 和大肠杆菌 (ATCC10231) 具有明显的抑菌活性。hBD-3 基因片段在酿酒酵母中的表达, 为进一步探讨 hBD-3 的生物活性及防御素应用安全性打下基础。

关键词: 人 β -防御素 3; 酿酒酵母; 分泌表达; 生物活性

文章编号: 1673-9078(2012)9-1123-1127

Secreted Expression of Human Beta-defensin-3 in *Saccharomyces cerevisiae*

WU Hui, CHEN Yi, XIAO Jun-mei, TANG Yu-qian

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: DNA fragment containing hBD-3 with α -factor in the upstream sequence was amplified and inserted into the shuttle plasmid-pYES2 of *Saccharomyces cerevisiae* after digestion. The recombinant vector called pYES2- α -factor-hBD3 was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1. The recombinant positive clones, which were screening by PCR reduced with 2% galactose. The recombinant protein could be detected in the cultured supernatant by protein assay reagents. Plate test indicated that the supernatant could inhibit the growth of *Escherichia coli* ATCC6538 and *Staphylococcus aureus* ATCC10231. The strategy of secretion expression of Human beta-defensin-3 gene in *Saccharomyces cerevisiae* may lay the foundation for further exploration of the biological activity and security application of the Human beta-defensin-3.

Key words: human beta-defensin-3; secreted expression; antimicrobial

防御素广泛存在于动植物体内, 是在诱导条件下、由机体产生的一类对抗外源性致病微生物的多肽物质, 是先天性免疫系统的重要组成部分之一。防御素具有广谱抗菌作用, 对革兰氏阳性和阴性菌、真菌、病毒和寄生虫均有一定的抑制作用^[1]。许多感染性疾病的患者体液中的防御素含量均高于正常水平^[1]。Bokarewa 等人发现, 类风湿关节炎患者的关节滑膜液中的防御素水平较正常人高约 10~60 倍^[2]。Espinoza 等人研究发现, 宫内感染的早产孕妇的羊水中防御素含量显著升高^[3]。

按结构防御素可以分为 α -型和 β -型。 β -防御素是一种阳离子内源性抗菌肽^[4], 一般由 38~42 个氨基酸

组成, 主要由哺乳动物的皮肤、黏膜等上皮细胞产生^[5]。hBD-3 是 Harder 等^[6]2001 年在牛皮癣患者破损组织中发现的第三种人源性 β -防御素。它由一个 α 螺旋和三个反向平行的 β 折叠构成, 含有三个二硫键^[7]。hBD-3 的抗菌范围较广, 对革兰氏阳性和阴性菌均有良好的抑制作用。而其他 β -防御素, 例如 hBD-1 和 hBD-2 仅对革兰氏阴性菌有抗性^[8]。Sahly 等^[9]人体外试验研究表明, hBD-3 对革兰氏阳性菌的最小抑菌浓度为 0.4~6.25 $\mu\text{g/mL}$, 对革兰氏阴性菌的最小抑菌浓度为 1.56~16 $\mu\text{g/mL}$ 。比其它防御素, 如 hBD-1、hBD-2 对细菌的最小抑菌浓度更低。hBD-3 还具有显著的抗真菌和抗病毒的活性: Feng 等人研究发现, hBD-3 可通过拮抗 CXCR4 来抵御免疫缺陷病毒^[10]。同时, hBD-3 在盐离子敏感性、对真核细胞无毒性等方面也优于其他防御素。Boniotto 等人的研究表明, hBD-3 空间结构的形成和作用方式均不受离子浓度的影响, 对维持 hBD-3 的高效抑菌活性有重要作用。Harder 等

收稿日期: 2012-05-01

基金项目: 华南理工大学百步梯攀登计划研究项目 (DA2091015); 华南理工大学 2012 “学生研究计划” (SRP)

通讯作者: 唐语谦 (1979-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品质量与安全, 分子生物学, 工业微生物

人指出,浓度高达 500 $\mu\text{g/mL}$ 的 hBD-3 仍未表现出明显的溶血活性^[6],对真核细胞损伤较小。此外, hBD-3 还有其他方面的生理功能。如 Funderburg 等^[11]人发现, hBD-3 可与 TLR1 和 TLR2 相互作用来间接诱导特定免疫细胞的分化,增强获得性免疫。Wang 等^[12]人研究发现, hBD-3 能够促进牙周成纤维细胞增殖成与健康牙周类似的网状结构,有助于实现牙齿根膜的再生。综上所述, hBD-3 具有广阔的研究与应用前景。

目前,国外内研究 hBD-3 主要采用大肠杆菌和毕赤酵母表达系统,例如赵亚华^[13]、代娟^[14]等人先后在毕赤酵母中成功表达了具有显著抗菌活性的重组 hBD-3。但未见采用酿酒酵母表达系统。随着基因工程的广泛应用,工程菌的安全性也越来越受关注。而酿酒酵母在食品业中已有数千年的应用史,是迄今为止最早、了解最完全、也是最安全的真核蛋白表达系统^[15],具有安全无毒、遗传背景清晰、培养条件简单、蛋白分泌能力良好、能对蛋白进行修饰加工等特点^[16]。利用酿酒酵母表达系统已生产出了多种疫苗、重组酶等^[17]。

本实验将 hBD-3 基因转入酿酒酵母表达系统中进行分泌表达,提取纯化蛋白,并对其抗菌活性进行研究,为 hBD-3 的研究与应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株

质粒 pPIC9K-hBD3 由本实验室构建保存。质粒 pYES2、表达宿主菌酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1 Ura⁻,由华南农业大学资源环境学院赵慧老师馈赠。*E. coli* DH5 α 由本实验室保存。金黄色葡萄球菌株(ATCC6538)和大肠杆菌株(ATCC10231)购自广州微生物菌种保存中心。

1.1.2 工具酶与生化试剂

限制性内切酶 *Kpn*I 和 *Bam*HI、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶及各类 Marker 购自连宝生物工程公司。Tryptone、Yeast Extract 购自 Oxoid 公司产品;酵母氮源(YNB)购自 Sigma 公司;其它试剂均为进口分析纯产品。引物合成和 DNA 序列测定由 Invitrogen 公司完成。

1.1.3 培养基

LB、YPD、SC、SC-U 等培养基配制参考《精编分子生物学实验指南》^[18]。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的扩增

根据质粒 pPIC9K-hBD3 上 α 信号肽和 hBD-3 基

因序列,采用 Primer Premier 5.0 软件,设计并合成以下扩增引物: P1: 5'TTCGGTACCATGAGATTCC TTCAATTTTT 3'(下划线处为 *Kpn*I 的酶切位点), P2: 5'AGTGGATCCCTAATTTCTTTCTTCGGCAG 3'(下划线处为 *Bam*HI 的酶切位点)。扩增产物长度为 420 bp。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 终止反应。

1.2.2 pY α -hBD3 表达载体的构建及筛选

对目的基因 PCR 后的产物和穿梭质粒载体 pYES2 分别经 *Kpn*I 和 *Bam*HI 双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳,割胶回收目的片段,再经 T4 DNA 连接酶将 α -hBD3 基因插入 pYES2 质粒,并转化 *E. coli* DH5 α 受体菌。挑取转化子,进行氨苄青霉素抗性筛选阳性克隆,提取阳性克隆质粒,用 PCR 及重组质粒双酶切鉴定后,送 Invitrogen 公司测序,分析克隆基因序列组成及其阅读框架的正确性。阳性重组质粒命名为 pY α -hBD3。

1.2.3 pY α -hBD3 质粒载体对酿酒酵母的转化及鉴定

醋酸锂法转化酿酒酵母 *S. cerevisiae* INVSC,以尿嘧啶营养缺陷型培养基(SC-U)筛选重组子,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~4 d 至培养板上阳性单克隆菌落明显。挑取生长较好的单菌落进行 PCR,以筛选阳性转化子。

1.2.4 hBD-3 在酿酒酵母中的诱导表达及表达量测定

将酵母阳性克隆转接至 50 mL SC-U 液体培养基(含 2% 葡萄糖)中,30 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,测 OD₆₀₀ 为 3,取 6.67 mL 培养物于 50 mL 离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 4000 r/min 离心 5 min,去上清,加 2~3 mL SC 诱导培养基(含 2% 半乳糖)重悬菌体,并转移至 50 mL 诱导培养基中,使稀释后的菌液 OD₆₀₀ 约为 0.4,30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养。在 0、2、4、6、8、12、14、16、24、36、48、60、72 h 十三个时间点各取 10 mL 培养液,离心收集上清液。

根据 BCA 使用说明配制蛋白标准及工作液,每 100 μL BCA 工作液,混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min,562 nm 下测定其吸光度。以蛋白浓度为横坐标,吸光值为纵坐标绘制标准曲线。取 13 个时间点收集的上清液 100 μL ,适当稀释后测其蛋白含量,以 INVSC1/pYES2 作为空白对照。重复 3 次。

1.2.5 hBD-3 抑菌活性检测

融化的 LB 培养基,加入终浓度分别为 10³、10⁴、10⁵ cfu/mL 的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,制成含菌平板,垂直放置无菌牛津杯并注入 200 μL 的待测上清液,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h,观察细菌生长情况。以未转化的酵母培养上清作为空白对照。观察不同菌液浓度下抑菌圈的大小。

2 结果与分析

2.1 pY α -hBD3 表达载体的构建及鉴定

以 pPIC9K-hBD3 为模板, P1、P2 为引物, 进行 PCR 扩增。PCR 产物的电泳结果显示, 扩增得到的 α -hBD3 DNA 片段约为 450 bp, 与预期大小相符 (见图 1)。将扩增所得 α -hBD3 基因片段与载体 pYES2 分别经 *Kpn*I 和 *Bam*HI 双酶切之后, 再经 T4 DNA 连接酶连接, 转化 *E.coli* DH5 α (见图 2)。提取大肠杆菌转化子质粒, 以 P1、P2 为引物进行 PCR 鉴定, 紫外光下可见的 450 bp 的特异性条带即为目的基因条带, 同时以 *Kpn*I 和 *Bam*HI 双酶切进一步鉴定 (图 3)。该克隆质粒的测序结果显示序列完全正确, 重组载体 pY α -hBD3 构建成功^[19]。

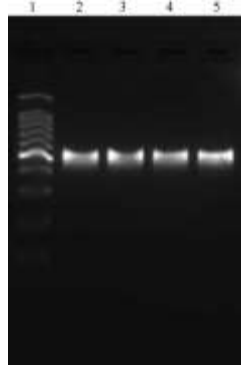


图 2 α -hBD3 基因的 PCR 结果

Fig.2 Agarose gel electrophoresis analysis of α -hBD3 products

Note: Lane 1, 100 bp DNA marker; lane 2-5, α -hBD3 gene

PCR products.

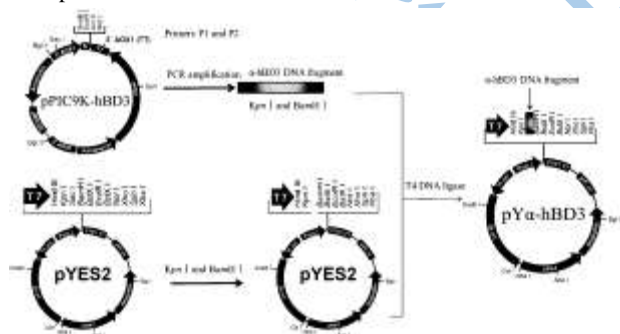


图 1 pY α -hBD3 表达载体的构建

Fig.1 Construction of pY α -hBD3 expression vector

2.2 酵母 INVSC1 的转化及转化子的鉴定

醋酸锂法将 pY α -hBD3 质粒转入酿酒酵母 INVSC1, SC-U 培养基筛选出阳性克隆, 随机选取 3 个转化子, 以宿主菌 INVSC1 作对照, P1 和 P2 为引物进行菌落 PCR 扩增鉴定 (见图 4)。结果表明, 这 3 株酵母阳性克隆转化子经菌落 PCR 均能大量扩增目

的基因片段 (450 bp), 而对照菌无任何扩增条带, 说明所挑取的阳性克隆均已成功转化 pY α -hBD3 重组质粒。PCR 产物测序结果与设计序列完全一致, 表明 α -hBD3 基因已经整合到酵母 INVSC1 中。

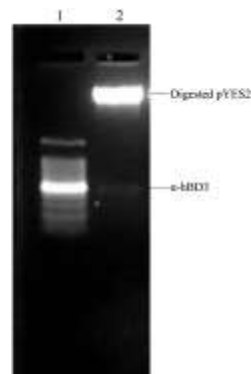


图 3 重组质粒 pY α -hBD3 双酶切鉴定电泳结果

Fig.3 Agarose gel electrophoresis analysis of the digested recombinant plasmid

Note: Lane 1, 100bp DNA marker; lane 2, digested recombinant plasmid pY α -hBD3.

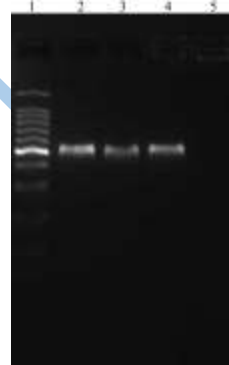


图 4 重组酵母菌落 PCR 的鉴定

Fig.4 Colony PCR identification of recombinant yeasts

INVSC1- pY α -hBD3

Note: lane1, 100 bp DNA marker; lane 2-4, INVSC1- pY α -hBD3-1, INVSC1- pY α -hBD3-2, INVSC1- pY α -hBD3-3; lane5, INVSC1.

2.3 重组蛋白的表达量测定

蛋白标准曲线如图 5 所示。将所取的诱导上清稀释 10 倍后, 测定其 562 nm 下的吸光值。根据标准曲线算出各时间点的诱导上清液的蛋白表达量 (如图 6 所示)。由图 6 可以看出, 重组酿酒酵母 INVSC1 在诱导的前 4 h 几乎没有表达。从第 4 h 开始, 防御素开始表达, 其表达量随着时间增大, 在 14~18 h 有一个短暂的平台期, 在 24 h 后表达量以指数形式增加, 在 60 h 进入平稳期, 60~72 h 之间表达没有进一步增加, 检测其最高表达量为 60.4 μ g/mL。

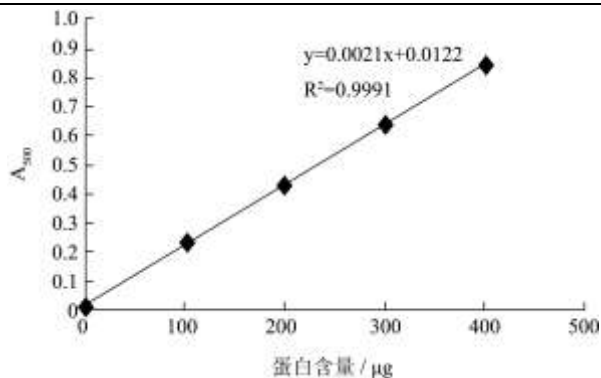


图5 蛋白标准曲线

Fig.5 the standard curve of protein

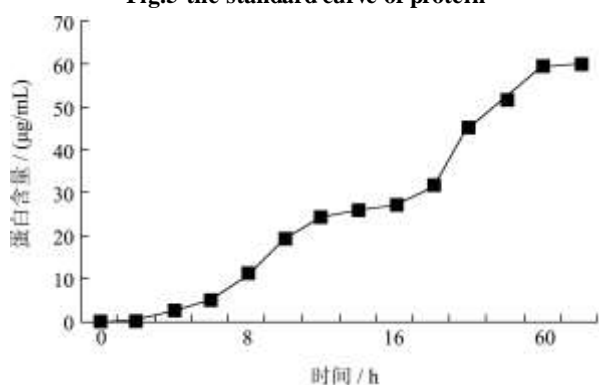


图6 重组蛋白的表达量曲线

Fig.6 the expression curve of recombinant protein

2.4 hBD-3 蛋白的生物活性



图7 hBD-3 蛋白的抗菌活性测定-金黄色葡萄球菌

Fig.7 Antimicrobial activity identification of human defensin-3 protein-*Staphylococcus aureus*

Note: N- *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1; S- *Staphylococcus aureus* 1-10³ cfu/mL; 2-10⁴ cfu/mL; 3-10⁵ cfu/mL.

取诱导培养的酵母菌上清进行抑菌试验(见图7、图8),以宿主菌 INVSC1 作为对照。金黄色葡萄球菌液和大肠杆菌液浓度梯度分别为 10³、10⁴、10⁵ cfu/mL。

结果显示, INVSC1 培养上清对金黄色葡萄球菌液和大肠杆菌基本没有抑制作用。而重组酵母 INVSC1/ pYα-hBD3 的上清对这 2 种细菌均有抑制作用,能抑制浓度达 10⁵ 的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的生长,但对大肠杆菌的抑制作用更强。



图8 hBD-3 蛋白的抗菌活性测定-大肠杆菌

Fig.8 Antimicrobial activity identification of human defensin-3 protein-*E. coli*

Note: N- *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1; E- *E. coli* 1-10³ cfu/mL; 2-10⁴ cfu/mL; 3-10⁵ cfu/mL.

3 结论

3.1 目前防御素的获得主要有三种方法:天然提取、化学合成和基因工程。天然提取和化学合成工艺复杂,成本高。基因工程方法是制备防御素更为有效、经济的方法。酿酒酵母一直被人们公认为是 GRAS,培养条件简单,易于大量培养发酵,遗传性状清晰稳定,是基因工程重要的真核基因受体菌。本实验采用酿酒酵母 INVSC1 作为 hBD-3 的表达系统,为 hBD-3 的生产应用安全性奠定基础。目前,国内外均未有关于 hBD-3 在酿酒酵母中表达的相关文献,本实验具有一定的前沿性。

3.2 张捷等^[20]指出,通过酿酒酵母表达系统得到的抗菌肽 Pa-AMP05 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌有较强的抑制作用。梁奉军^[21]构建的可表达免疫活性小肽 IMP 的重组酿酒菌 H158 可显著提高育苗的成活率。本实验所获得的重组表达防御素 hBD-3 能抑制浓度达 10⁵ 的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的生长。这说明运用酿酒酵母表达所得重组防御素具有一定的抗菌活性,为进一步研究防御素的酿酒酵母表达提供了前提和依据。

3.3 本实验将 α 信号肽和 hBD-3 基因序列结合,诱导 hBD-3 的胞外表达。与胞内表达相比,分泌到胞外的外源防御素受宿主自身蛋白酶等消化威胁减弱,不但易于提取与纯化,而且结构和功能更加稳定。由于即时将产物导出胞外,降低了胞内产物积累压力,更有利于提高表达产量。

3.4 利用酿酒酵母表达外源基因一般使用半乳糖作为诱导剂,外源蛋白在启动子 CAL 控制下得到表达。本实验将酵母阳性克隆首先在葡萄糖的培养基中生长至对数期,然后在含 2% 的半乳糖培养基中进行诱导表达^[17]。对数期的酿酒酵母生长繁殖迅速,对营养物

质需求旺盛,加入的半乳糖能作为碳源被迅速利用,诱导蛋白表达,从而在一定程度上增加了 hBD-3 蛋白的表达速度与水平。

但是本实验仍有许多方面值得思考与改进。例如:Harder 等^[6]人报道指出,天然 hBD-3 对革兰氏阳性菌具有显著的抑制作用。本抑菌实验中, hBD-3 对革兰氏阴性菌的抑制作用要优于革兰氏阳性菌。可能是因为酿酒酵母表达外源蛋白时,会受到转录水平、表达载体的拷贝数与稳定性、产物的加工修饰等因素影响,出现产物蛋白不均一、过度糖基化、多聚体等现象^[16],致使重组防御素与天然防御素的功能活性存在一定的差异。所以下一步,在对重组 hBD-3 的生物活性与结构进一步研究的基础上,协同各种因素对酿酒酵母表达系统与条件进行进一步的优化设计。

目前有关于 hBD-3 蛋白在酿酒酵母中的表达几乎未见有报道。本实验首次构建了 hBD-3 基因的酿酒酵母表达载体,并转化至酿酒酵母 INVSC1 表达系统中,获得了具有一定生物活性的 hBD-3 蛋白,为今后的进一步研究 hBD-3 蛋白的生物学活性、作用机理及合成途径等方面,开发新型的抗细菌、抗病毒药物及其应用安全性奠定了基础。

参考文献

- [1] Robert E H. Hancock. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials [J]. THE LANCET Infectious Diseases. 2001, 1: 156-164
- [2] Bokarewa M I, Jin T, Tarkowskia, et al. Intraarticular release and accumulation of defensins and bacterial/permeability increasing protein in patients with rheumatoid arthritis [J]. Journal of Rheumatol. 2003, 30(8): 1719-1724
- [3] Espinoza J, Chaiworapongsa T, Romero R, et al. Antimicrobial peptides in amniotic fluid defensin, calprotectin and bacterial/permeability increasing amniotic inflammation preterm labor and premature rupture of membranes [J]. Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine. 2003, 13(1): 2-21
- [4] Yuping Lai, Richard L Gallo. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense[J]. Trends in Immunology. 2009, 30(3): 131-141
- [5] 袁雪波,郭荣富,陈恒灿.β-防御素的研究进展及其应用前景[J].中国畜牧兽医文摘,2009,3:56-57
- [6] Harder J, Bartels J, Christophers E. Isolation and Characterization of Human b-Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic [J]. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 2001, 276(8): 5707-5713
- [7] 王少然,杨雅麟,张军,等.防御素构效关系研究进展[J].生物技术通报,2011,4:40-45
- [8] 李嘉,钟礼立.人 β 防御素 3 研究进展[J].医学综述,2009, 15(7):1005-1008
- [9] Sahly H, Schubert S, Harder J, et al. *Burkholderia* Is Highly Resistant to Human Beta-Defensin 3 [J]. Antimicrob. Agents Chemother. 2003, 47(5): 1739-1741
- [10] Feng Zhimin, Dubyak R G, Michael M. Cutting edge: human β- defensin-3: a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4 [J]. Journal of Immunol. 2006, 177(2): 782-786
- [11] Funderburg N, Lederman M M, Feng Zhimin. Human β-defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2 [J]. PNAS. 2007, 104(47): 18631-18635
- [12] Wanga H, Watanab H. Effect of human beta-defensin-3 on the proliferation of fibroblasts on periodontally involved root surfaces[J]. Pepti-des. 2011, 32: 888-894
- [13] 赵亚华,黄蓬亮,徐来祥,等.人 β 防御素 3 基因在巴斯德毕赤酵母细胞中的表达[J].曲阜师范大学学报,2006,32(2):107-110
- [14] 代娟.人 β -防御素-3 在毕赤酵母中的分泌表达及活性研究[D].广州:中山大学,2010
- [15] 唐香山,张学文.酿酒酵母表达系统[J].生命科学研究,2004, 8(2):106-109
- [16] Nielsen J, Jewett C M. Impact of systems biology on metabolic engineering of *Saccharomyces Cerevisiae* [J]. FEMS Yeast Res. 2007, 8: 122-131
- [17] 郭钦.食品级酿酒酵母高效分泌/展示表达系统构建[D].杭州:浙江大学生物系统工程与食品科学学院,2009
- [18] 奥斯伯.精编分子生物学实验指南(第 5 版)[M].北京:科学出版社,2008
- [19] 邓鸿铃.利用 PCR 方法检测转基因大豆加工食品中的修饰基因[J].现代食品科技,2005,21(1):111-114
- [20] 张捷,张文官,黄杰,等.酿酒酵母表达基因工程抗菌肽 Pa-AMP05 的抗菌活性研究[J].中国饲料,2011,6:24-26
- [21] 梁奉军.酿酒酵母表达免疫活性小肽及其在鱼类养殖中的效应研究[D].济南市:山东大学,2007