

# 杀菌/通透性增加蛋白基因的克隆及在 CHO 细胞中的表达

徐俊杰 徐 静 王海涛

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

**摘 要:**从一名健康中国人外周血白细胞中克隆出杀菌/通透性增加蛋白(*BPI*)基因,全长 1452bp,编码 27 个氨基酸的信号肽和 456 个氨基酸成熟蛋白。序列比较发现,此序列与国外发表的序列有 6 个核苷酸的差异,编码蛋白有 4 个氨基酸的差异。构建真核表达质粒,在 CHO 细胞中实现 *BPI* 基因的稳定表达。对重组蛋白初步纯化后进行杀菌实验,结果表明重组蛋白具有与天然蛋白同样的生物活性。

**关键词:** 杀菌/通透性增加蛋白,基因克隆,表达,CHO 细胞

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209 (2001) 06-0669-05

杀菌/通透性增加蛋白(Bactericidal/permeability-increasing protein, *BPI*)是人和许多哺乳类动物白细胞中存在的一种碱性蛋白,它能与革兰氏阴性菌脂多糖(LPS)结合,具有中和内毒素和杀灭细菌作用<sup>[1]</sup>。人 *BPI* 基因位于第 20 号染色体上,完整蛋白由 456 个氨基酸组成,其活性部位主要在蛋白氨基端约 200 个氨基酸(*BPI*<sub>23</sub>)<sup>[2]</sup>。临床前试验和临床试验表明重组 *BPI* 及其衍生物在革兰氏阴性菌感染的治疗方面有良好的发展前景<sup>[3]</sup>。

为开展对 *BPI* 的研究,我们从一名健康中国人体内克隆出 *BPI* 全长基因,并在 CHO 细胞中实现稳定表达,获得的重组蛋白(*rBPI*)具有与天然蛋白同样的杀菌活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

外周血白细胞取自一名健康中国人。限制性内切酶,反转录酶,T4DNA 连接酶,ExTaq 酶购自 TaKaRa 公司。Trizol 试剂,Lipofect AMINE 2000 脂质体试剂购自 Gibco-BRL 公司。引物由上海博亚生物公司合成。测序由大连宝生物公司完成。细胞培养基,血清及辅助试剂购自 Gibco-BRL 公司和 HyClone 公司。SP-Sepharose 购自 Pharmacia 公司。BPIELISA Kit 购自 Hbt 公司。真核表达载体 pCMV-dhfr, CHO-dhfr-细胞, *E. coli* J5 株由本实验室保存。

### 1.2 *BPI* 基因的克隆

用 Trizol 试剂从外周血白细胞中提取总 RNA,用 Oligo-d(T)为引物反转录成 cDNA,进行半巢式 PCR 扩增出 *BPI* 基因。引物设计参考国外已发表的 *BPI* 基因序列<sup>[4]</sup>。

5'端引物:5'-CTAGTCTAGAATGCCAGGGGTCCTTGCAAC-3';

3'端内引物:5'-TCCCCGGGTCATTTATACACAACGTCTGC-3';

3'端外引物:5'-GCGATCATTCTGAATCTGAG-3'。

作者简介:徐俊杰(1972-),男,江苏南京人,博士研究生,主要从事分子微生物学研究。

收稿日期:2001-01-04,修回日期:2001-04-18

反应条件:第一轮为 94℃ 40s, 50℃ 40s, 72℃ 120s, 25 个循环;第二轮为 94℃ 40s, 55℃ 40s, 72℃ 120s, 30 个循环。PCR 产物用 *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切后与经同样双酶切的真核表达载体 pCMV-dhfr 相连, 构建重组质粒 pC-BPI, 酶切鉴定后进行序列分析。

### 1.3 质粒的转染

CHO-dhfr-细胞用含 HT 和 10% 经透析的 FCS 的完全 IMDM 培养液培养于 24 孔板中, 重组质粒 1 $\mu$ g 用 Lipofect AMINE 2000 脂质体试剂转染, 按试剂盒说明操作。转染 24h 后, 用 96 孔板进行克隆化, 同时换成无 HT 的培养液。2 周后对长成的单克隆进行检测。

### 1.4 表达产物的检测和表达细胞株的加压筛选

培养上清用 BPI ELISA 试剂盒进行检测。对表达量较高的克隆转至 24 孔板中培养, 用氨甲喋呤(MTX)加压筛选提高表达量。

### 1.5 rBPI 的初步纯化

培养上清离心去细胞残渣, 按每 50 $\mu$ L/mL 比例加入 SP-Sepharose, 在摇动状态下室温结合 2h。树脂用 10 倍体积 20mmol/L Tris-Cl 缓冲液 (pH7.6, 含 0.1mol/L NaCl) 洗两次, 用含 1mol/L NaCl 的同样缓冲液洗脱下结合蛋白。获得的蛋白用 12% SDS-PAGE 观察纯化效果, 然后用 ELISA 定量后用于杀菌试验。

### 1.6 杀菌试验

*E. coli* J5 株用 PBS 稀释至  $5 \times 10^6$ /mL, 取 200 $\mu$ L 与不同浓度的 rBPI 37℃ 作用 1h, 然后取一定量混合液涂布 LB 平板计数菌落; 或在混合液中加入 2mL LB 培养基, 37℃ 摇床培养, 每隔 2h 测  $OD_{600}$ 。为观察  $Mg^{2+}$  对 rBPI 的抑制作用, 在上述反应液中加入不同浓度的  $MgCl_2$ , 同样操作。

## 2 结果

### 2.1 BPI 基因的克隆和序列分析

用 PCR 成功地从一名健康中国人外周血白细胞中扩增出 BPI 基因, 并进行了序列测定。所测序列已在 Genebank 注册, 注册号为 AF322588。序列分析显示, 该基因全长 1459bp, 编码 27 个氨基酸的信号肽和 456 个氨基酸的成熟蛋白, 与国外发表的序列 (J04739) 有 6 个核苷酸的差异, 编码蛋白有 4 个氨基酸的差异 (表 1)。

表 1 BPI 测定序列和报道序列差异比较

Table 1 Differences between BPI sequences determined here and reported

	Nucleotide site (Amino acid site)					
	35(-16)	51(-11)	534(151)	1051(324)	1198(373)	1220(380)
AF322588	G(A)	G(L)	G(V)	T(S)	G(D)	G(R)
J04739	T(V)	C(L)	C(V)	C(P)	A(N)	A(K)

### 2.2 BPI 基因在 CHO 细胞中的表达

构建了真核表达质粒 pC-BPI (图 1), 该质粒带有 dhfr 基因, 可用 MTX 进行加压筛选。将该质粒转染 CHO 细胞, 经克隆化和 MTX 加压筛选, 获得稳定表达的细胞株。在 MTX 浓度为 0.1 $\mu$ mol/L 时, 该细胞株培养上清的表达量约为 1 $\mu$ g/mL (用 ELISA 定量)。

### 2.3 rBPI 的初步纯化

经 SP-Sepharose 初步纯化,可去除培养上清中大量血清蛋白,并使重组蛋白有效浓缩,在 SDS-PAGE 可见分子量约 55kD 的重组蛋白条带(图 2)。

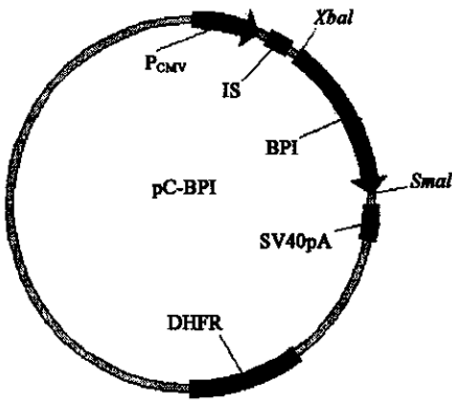


图 1 表达质粒 pC-BPI 示意图

Fig. 1 Model of Expression plasmid pC-BPI

$P_{CMV}$ , CMV promoter; SV40pA, SV40 poly(A) signal; IS, Intron sequence; DHFR, Dihydrofolate reductase gene.

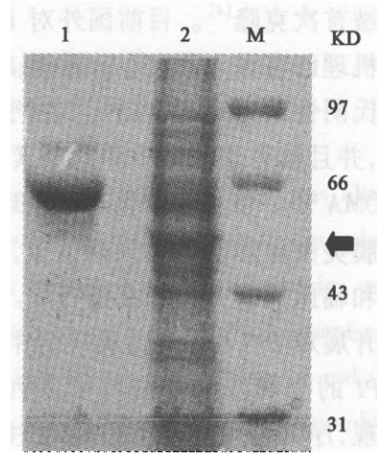


图 2 rBPI 初步纯化结果

Fig. 2 Simple purification of rBPI

1. Culture supernatant; 2. SP-sepharose eluate; Arrow shows position of rBPI; M. Protein marker.

### 2.4 rBPI 杀菌活性检测

无论平板计数法或测  $OD_{600}$  法,均显示 rBPI 具有杀菌活性(图 3,4),在浓度为 5nmol/L 时, *E. coli* J5 菌生长即产生明显抑制,在浓度为 10nmol/L 时,抑制率大于 90%。在反应液中加入一定浓度的  $MgCl_2$  后发现 BPI 的杀菌活性受到抑制,当  $MgCl_2$  浓度达到 50mmol/L 时,抑制率大于 90%(图 5)。

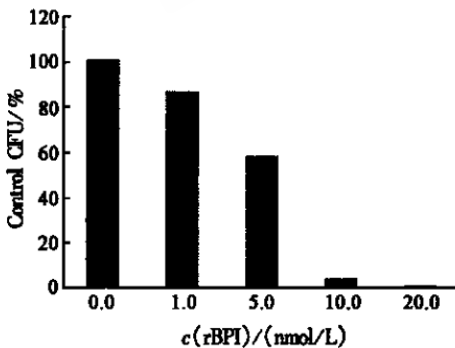


图 3 平板计数试验检测 rBPI 杀菌活性结果

Fig. 3 Bactericidal activity of rBPI determined with a plating assay

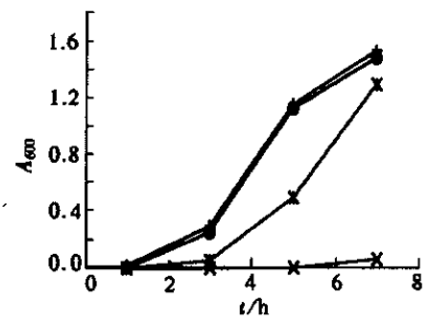


图 4 细菌培养试验检测 rBPI 的杀菌活性结果

Fig. 4 Bactericidal activity of rBPI determined with a broth growth assay

—●— rBPI (10nmol/L); —▲— rBPI (5nmol/L); —■— rBPI (1nmol/L); —+— Control.

### 3 讨论

BPI 在 70 年代末被发现,人 BPI 基因在 80 年代末被首次克隆<sup>[4]</sup>。目前国外对 BPI 晶体结构和杀菌机理已有深入研究<sup>[5]</sup>。重组 BPI 作为潜在的革兰氏阴性菌治疗药物的优点在于它是人体自身蛋白,并且具有杀菌和中和内毒素的双重作用。美国 XOMA 公司将 BPI 的衍生物 rBPI<sub>21</sub> 用作治疗小儿脑膜炎菌血症已完成三期临床,即将上市,其它临床和临床前研究也正在进行<sup>[6]</sup>。

为开展对 BPI 的研究,从一名中国人体内克隆出 BPI 的全长基因并进行了序列分析。序列比较发现,序列和国外在 Genbank 注册序列有一定的差异。由于在 PCR 中使用的是有校正功能的 Ex Taq 酶,并且采用双向测序,因此这种差异是 PCR 或测序造成的可能性较小。不同个体间 BPI 序列有所不同已有一些报道<sup>[7]</sup>,表明人群间 BPI 可能存在一定多态性,正对这一问题进行研究(另文报道)。

曾尝试在原核系统中表达 BPI,结果由于 BPI 的杀菌特性,分泌表达不可能,而包涵体状态表达复性困难,所以改在 CHO 系统中进行表达。为提高表达量,在质粒构建时,加入人工内含子序列,并选用 DHFR 基因作为筛选和加压标志。目前工程株的加压还在进行,在 MTX 浓度为 0.1μmol/L 时表达量约 1μg/mL,已比加压前(结果未显示)提高约 20 倍。

为检测 rBPI 的杀菌活性,首先对 rBPI 进行了初步纯化。由于 BPI 是碱性蛋白,等电点为约 9.4,选用阳离子交换树脂 SP-Sepharose 进行纯化。经过一步纯化,大量的血清蛋白被去除,rBPI 得到富集。杀菌试验证实了重组蛋白具有杀菌活性。当在反应液中加入一定浓度的 MgCl<sub>2</sub> 后 rBPI 的杀菌活性受到抑制,由于 Mg<sup>2+</sup> 会影响 BPI 与细菌的结合,从而抑制 BPI 的活性,因此 Mg<sup>2+</sup> 抑制试验进一步证实了 rBPI 的生物活性。

本研究成功实现了 BPI 基因的克隆和在 CHO 细胞中的表达,为今后的研究和应用打下基础。

### 参 考 文 献

[ 1 ] Elsbach P. *J Leukoc Biol*, 1998, **64**(1):14 ~ 18.  
 [ 2 ] Gray P W, Corcorran A E, Eddy R L, et al. *Genomics*, 1993, **25**(1):188 ~ 190.  
 [ 3 ] Elsbach P, Weiss J. *Curr Opin Immunol*, 1998, **10**(1):45 ~ 49.  
 [ 4 ] Gray P W, Flaggs G, Leong S R, et al. *J Biol Chem*, 1989, **264**(16):9505 ~ 9509.  
 [ 5 ] Beamer L J, Carroll S F, Eisenberg D. *Science*, 1997, **276**:1561 ~ 1864.  
 [ 6 ] [Http://www.xoma.com/](http://www.xoma.com/).  
 [ 7 ] 陈 薇,黄 策,王海涛,等.微生物学通报,1997;**24**(6):350 ~ 353.

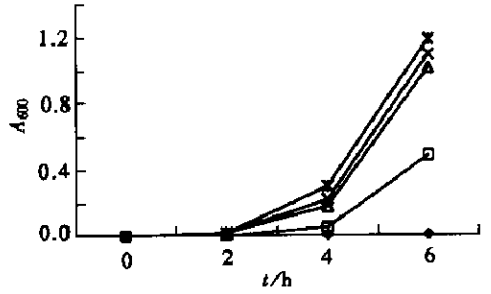


图 5 Mg<sup>2+</sup> 对 rBPI 杀菌活性的影响  
 Fig.5 Effect of Mg<sup>2+</sup> on bactericidal activity of rBPI  
 ◇—rBPI (10mmol/L); □—rBPI + MgCl<sub>2</sub> (20mmol/L); △—rBPI + MgCl<sub>2</sub> (50mmol/L); ×—rBPI + MgCl<sub>2</sub> (100mmol/L); \*—Control + MgCl<sub>2</sub> (100mmol/L).

## GENE CLONING AND EXPRESSION OF HUMAN BACTERICIDAL/ PERMEABILITY-INCREASING PROTEIN

Xu Junjie Xu Jing Wang Haitao

(*Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China*)

**Abstract:** The gene of human bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) was cloned from peripheral blood lymphocytes of a normal Chinese individual. The result of sequencing showed the gene is 1452bp encoding a 27-residue signal peptide and a 456-residue matured protein, and it has six nucleotide variations compared with the sequence reported which results in 4 different amino acids. In order to get recombinant BPI, the gene was cloned into an expressing plasmid and expressed in CHO cells. The recombinant protein was purified using cation-exchange chromatography and its bioactivity was proved with bactericidal assays.

**Key words:** Bactericidal/permeability-increasing protein, Gene cloning, Expression, CHO cells