

中国家蚕抗菌肽人工合成类 CMIV 基因在甜菜夜蛾虫体中的表达*

赵东红¹ 戴祝英¹ 周开亚¹ 张林元²

(¹ 南京师范大学生命科学院 南京 210097)

(² 南京军区军事医学研究所 南京 210012)

摘 要:将人工合成的中国家蚕抗菌肽类 CMIV 基因与抗菌肽信号肽基因连接,经 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切后,克隆于 pFASTBac I 的 *EcoR* I、*Hind* III 酶切位点之间,得到重组转座载体 pFASTBac-ABP,经测序证明阳性克隆正确。将重组转座载体转化 HD10Bac 大肠杆菌,得到重组 Bacmid-ABP。将重组 Bacmid 转染 sf21 细胞及感染甜菜夜蛾(*Laphygma exigua*)幼虫,在培养细胞上清及虫体血淋巴中均测到抗菌活性。经 Northern blotting 证明感染甜菜夜蛾幼虫中有类 CMIV mRNA 的存在。且表达产物在酸性电泳中电泳行为与天然抗菌肽 CMIV 组分相似。为进一步利用昆虫细胞及虫体生产抗菌肽药物打下了基础。

关键词:中国家蚕抗菌肽类 CMIV 基因,昆虫杆状病毒表达系统, Bac-to-Bac 策略, sf21 细胞,甜菜夜蛾幼虫

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 06-0680-06

昆虫抗菌肽(antibacterial peptide, ABP)是昆虫免疫后产生的一类抗菌多肽^[1,2]。抗菌肽 CMIV 是中国科学家首次从家蚕中分离纯化并测定一级序列的^[3],它由 35 个氨基酸残基组成,无免疫原性,对热和酸碱稳定,具有广谱抗菌及抗癌活性^[4,5],有望成为新型的抗菌抗癌药物。

为了更好地研究抗菌肽的作用机理以及提高其抗菌抗癌活力,李秀兰等^[6]根据天然抗菌肽 CMIV 的基因结构,在计算机的帮助下,对其基因进行了近 60% 的改造,设计并合成了一种新型的抗菌肽基因一类 CMIV 基因。为了模拟天然抗菌肽,在其终止密码子前设计了一个天冬酰氨密码子 AAC,以便直接翻译出 C-末端带酰胺的多肽。我们虽然已成功地在大肠杆菌中表达了类抗菌肽基因并得到活性^[6],但是大肠杆菌表达系统还存在内毒素污染等问题,因而影响了表达产物的临床应用。

为了更好地研究该抗菌肽的特性,需要构建一个高效表达的体系,以制备大量抗菌肽。Bac to Bac 杆状病毒表达系统是目前最好的杆状病毒克隆表达策略^[7],该系统不需空斑纯化,因此大大减少了鉴定和纯化重组病毒的时间。本文采用新型的 Bac to Bac 杆状病毒表达系统表达了该抗菌肽基因,在-sf21 细胞及甜菜夜蛾(*Laphygma exigua*)幼虫虫体中得到了抗菌活性。为进一步利用昆虫细胞及虫体生产抗菌肽药物打下了基础。

* 国家自然科学基金资助项目(39670116)

作者简介:赵东红,讲师,在职博士生,从事分子细胞生物学方面的研究,联系人。Tel:025-3598500; e-mail: zhaodhong@21cn.com

收稿日期:2000-11-29,修回日期:2001-02-03

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、病毒和细胞: AcNPV 的 Bac-to-Bac 系统: 转座质粒 pFastBac 1、大肠杆菌 DH10Bac、穿梭载体 Bacmid 购自 Gibco BRL 公司, 大肠杆菌 DH5 α 为本室保存。

草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞 sf21 由美国南加州大学医学院惠赠, 细胞在含有 10% 胎牛血清的 TNM-FH 培养基中 27 $^{\circ}$ C 培养。甜菜夜蛾幼虫从南京农业专科学校购买。AcNPV 野生病毒由南京大学秦俊川教授赠送。

1.1.2 试剂: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、IPTG、X-gal 均购自大连宝生生物制品公司, Cellfectin 购自 GIBCO BRL 公司。RNA 购自 Promega 公司。其他试剂均为分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建及酶切鉴定: 参照文献[8]进行。

1.2.2 重组 Bacmid 的筛选及转染细胞: 将重组 pFastBac 转化 DH10Bac 大肠杆菌感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 复苏 4h 后, 连续 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 倍稀释, 分别涂布含三抗 (50 μ g/mL 卡那霉素、7 μ g/mL 庆大霉素、10 μ g/mL 四环素、100 μ g/mL X-gal、20 μ g/mL IPTG) 的 LB 平板。37 $^{\circ}$ C 培养 24 ~ 48h 后挑选单个白色菌落, 于 LB 平板上划线以区分表型, 37 $^{\circ}$ C 过夜后再挑单个白色克隆, 液体培养以提取重组 Bacmid DNA。

1.2.3 重组 Bacmid 转染 sf21 细胞: 每 10mL 细胞瓶接种 1.5×10^6 个 sf21 细胞, 使用 TNM-FH 培养基于 27 $^{\circ}$ C 培养, 待细胞贴壁后, 用 Cellfectin 与重组 Bacmid 共转染, 72h 后待 sf21 细胞出现病变, 收集含有重组杆状病毒颗粒的培养上清液, 其病毒滴度约为 2×10^7 pfu/mL, 以此作为毒种, 再去感染 sf21 细胞以扩增病毒, 使其滴度达到 2×10^8 pfu/mL。

1.2.4 重组杆状病毒感染 sf21 细胞及抗菌肽的表达: 以感染复数 M. O. I = 10PFU/CELL 的剂量重新感染 sf21 单层细胞 2h, 移去旧培养基, 加入新鲜培养基于 27 $^{\circ}$ C 培养。分别于不同时间取上清液经真空浓缩 20 倍后, 以 10 μ L 进行抗菌活力平板测定。

1.2.5 重组杆状病毒在甜菜夜蛾幼虫中的表达及产物分析: 将甜菜夜蛾幼虫虫卵在 25 $^{\circ}$ C 孵化成幼虫, 分装于青霉素瓶内, 以人工饲料喂养至五龄时, 每头幼虫注射上述毒种 1 ~ 2 μ L (10^8 pfu/mL), 1 ~ 4d 每天剪幼虫倒数第二对腹足收集血淋巴液, 离心后将上清液进行平板测活及酸性电泳分离纯化。凝胶浓度为 15%, pH4, 酸性电泳条件及电泳后测活均参见文献^[9]。其中以琼脂糖代替琼脂铺含菌平板, 30 $^{\circ}$ C 培养过夜。

1.2.6 Northern blot 分析: 以 Northern blot 研究抗菌肽基因的 mRNA 在甜菜夜蛾幼虫虫体中的表达情况。重组病毒感染虫体不同时间后, 收集虫体, 由 Promega 公司的总 RNA 提取试剂盒提取脂肪体总 RNA, 在 1.2% 的甲醛-琼脂糖变性胶上电泳后, 上行转移至带正电荷的尼龙膜上, 抗菌肽基因探针由 Roche 公司 DIG 标记试剂盒标记, 杂交及洗膜在 42 $^{\circ}$ C 按照 DIG 杂交试剂盒说明书进行。

2 结果

2.1 重组转座载体的构建及鉴定

本实验要在人工合成类抗菌肽基因前面接上一个天然抗菌肽信号肽基因, 信号肽末

端密码子与类抗菌肽第一个密码子可构成 *Avr* II 酶切位点。PCR 引物设计保证信号肽基因 3'端与类抗菌肽基因 5'端可以在 *Avr* II 酶切位点处拼接后,保持阅读框不变,氨基酸没有增减。

以含天然抗菌肽信号肽基因的质粒 PinPoint Xa-1 T [genebank 序列号: AF 303891] 为模板,设计 2 个引物:引物 1 为 5'-GGG GAA TTC ATG AAC TTC GCA AAG ATC CT-3' 含有 *Eco*R I 酶切位点,引物 2 为 5'-CAC TCG AGC CTA GGT TCT GGA GCA GCG CT-3' 含有 *Avr* II 酶切位点,以扩增天然抗菌肽信号肽基因。以含有人工合成类抗菌肽基因的 PUC118 质粒^[6]为模板,设计 2 个引物:引物 3 为 5'-GAG CCT AGG CCT AAA TGG AGA GTC TTC-3', 含有 *Avr* II 酶切位点,引物 4 为 5'-CAC AAG CTT ACT AGT TGA GTG CCT TCG C-3', 含有 *Hind* III 酶切位点及终止密码子, GTT 为天冬酰胺密码子,以扩增人工合成类抗菌肽基因。信号肽基因经 *Eco*R I、*Avr* II 双酶切,成熟肽基因经 *Avr* II、*Hind* III 双酶切, pFastBac 经 *Eco*R I、*Hind* III 双酶切,三个酶切产物在 T4 DNA 连接酶作用下,构成含有信号肽的类抗菌肽基因的重组转座载体(见图 1)。

转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性克隆,进行 *Eco*R I、*Hind* III 双酶切鉴定,得到正确的重组转座载体。经本实验室的 ABI310 遗传序列分析仪测序,所测序列与信号肽及类抗菌肽基因的连接片段序列一致,共 209bp(连酶切位点在内)。

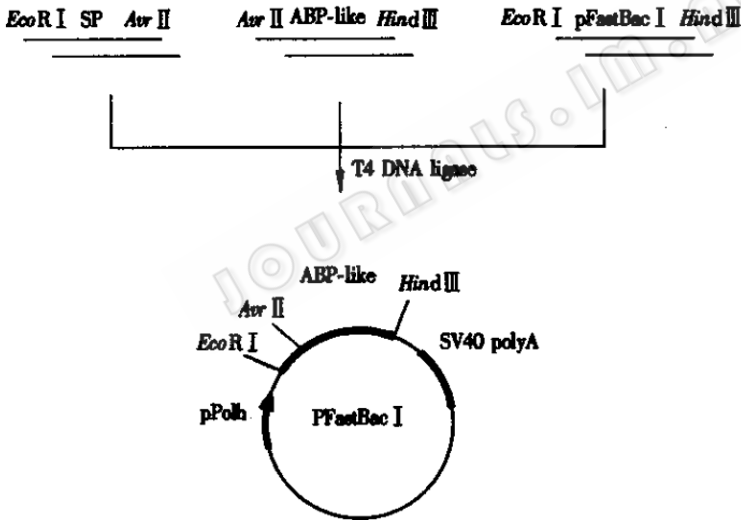


图 1 重组转座载体的构建

Fig.1 Construction of recombinant transposing vector

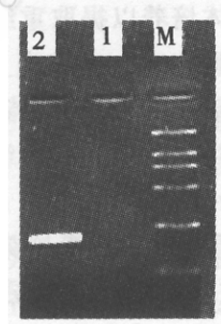


图 2 重组 Bacmid PCR 产物鉴定

Fig.2 Identification of recombinant Bacmid by PCR amplification
M. DL2000; 1. Positive control;
2. PCR products of Bacmid-ABP-like(209bp).

2.2 重组 bacmid 的鉴定

重组 pFastBac 转化 PH10BAC 感受态细胞,挑取白色菌落提取重组质粒 Bacmid,紫外透射仪下可见高分子量 DNA 条带,以此作为 PCR 模板,用上述引物 1 和引物 4 进行 PCR,能扩增出特异的信号肽与类抗菌肽基因连接片段,经 GDS-8000 图像分析系统(UVP)扫描成像,与预期的 DNA 片段相一致(见图 2)。

2.3 重组 Bacmid 转染 sf21 细胞

重组 Bacmid 转染 sf21 细胞 3d 后, 倒置显微镜下可见转染的细胞产生明显的病变, 即细胞膨大, 特别是细胞核膨大, 在细胞内可见许多折光性强的不规则颗粒, 与正常 sf21 细胞差别明显。

2.4 人工合成类抗菌肽基因在 sf21 细胞及虫体中的表达

以 M.O.I = 10 PFU/cell 的重组病毒和野生病毒感染 sf21 细胞, 重组病毒感染的细胞培养液经浓缩 20 倍后及甜菜夜蛾血淋巴原液中的抗菌肽表达的时间曲线(见图 3)。抗菌肽活力由平板法测定, 单位按照文献^[10]的方法确定。由图可见重组病毒感染单层细胞后第 3d 表达水平最高。离心沉淀的细胞反复冻融破碎后, 抽提液未测出抗菌活力, 表明表达的抗菌肽已基本完全分泌至胞外。幼虫感染重组病毒后第 4d 表达水平最高, 第 5d 开始出现死亡。野生病毒感染的细胞上清液及甜菜夜蛾血淋巴均基本未见有抗菌活力。

2.5 Northern Blotting 分析

甜菜夜蛾幼虫在感染重组病毒后, 于不同时间采集脂肪体提取总 RNA 用于分析类抗菌肽 mRNA 的表达情况。每一条泳道的 RNA 上样量相同。图 4 的结果表明, 用 DIG 标记的抗菌肽特异性探针杂交得到一条约 600bp 的 mRNA 条带, 虫体自感染 48h 后, 开始出现 mRNA 的杂交条带, 之后表达量逐渐增加, 96h 达到最高水平。而野生病毒感染的虫体与抗菌肽特异性探针杂交, 没有 mRNA 杂交带出现(结果未显示)。说明甜菜夜蛾重组病毒感染甜菜夜蛾后, 特异性地表达了重组抗菌肽, 并且在第 4d 表达量最高, 与活性分析曲线相符。第 5d 虫体开始出现死亡, 故未采样进行 Northern Blotting 分析。

2.6 类抗菌肽基因表达产物的纯化

虫体血淋巴比细胞上清液中的活力高约 40 倍, 因此仅用虫体血淋巴进行分离纯化。取虫体血淋巴进行酸性电泳, 电泳结束后, 将凝胶分成两半, 一半 4℃ 保存, 另一半上面铺一层含菌培养基, 进行抗菌活力测定, 结果泳道上出现一个抑菌斑, 说明血淋巴中仅有一个抗菌活力组分, 结果见图 5 的 B1 泳道。将 4℃ 保存的一半胶在抑菌斑的相应位置割下条带, 进行蛋白抽提, 测定类抗菌肽蛋白含量, 其电泳行为为单一活性组分, 且在酸性电泳中电泳行为与天然抗菌肽 CM4 组分相似, 结果见图 5 的 A1 ~ A4 泳道。经纯化后, 每毫升虫体血淋巴中能得到抗菌肽 80μg。

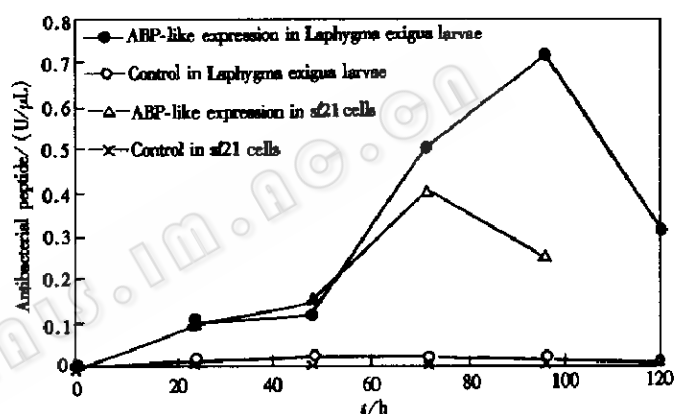


图 3 类抗菌肽在 sf21 细胞及虫体中表达的时间曲线

Fig. 3 Time course of ABP-like expression in sf21 cells and laphygma exigua larvae

出现(结果未显示)。说明甜菜夜蛾重组病毒感染甜菜夜蛾后, 特异性地表达了重组抗菌肽, 并且在第 4d 表达量最高, 与活性分析曲线相符。第 5d 虫体开始出现死亡, 故未采样进行 Northern Blotting 分析。

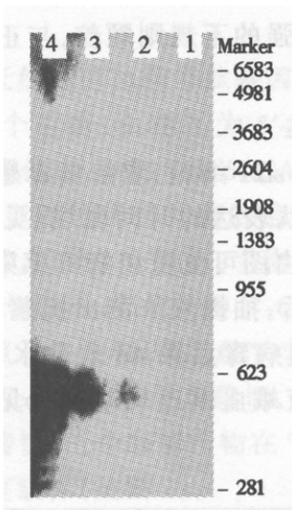


图 4 甜菜夜蛾虫体表达类抗菌肽 mRNA 的 Northern blot 结果

Fig. 4 Northern blot analysis of RNA from *Laphygma exigua* larvae infected with recombinant virus 1. 24h; 2. 48h; 3. 72h; 4. 96h.



图 5 类抗菌肽酸性电泳纯化结果及酸性电泳测活结果

Fig. 5 Acid electrophoresis purification of expression protein

A1: *Laphygma exigua* hemolymph infected with wild virus; A2: *Laphygma exigua* hemolymph infected with recombinant virus; A3: purified ABP-like; A4: purified CM4 from silk worm; B1: band with antibacterial activity localized using an overlay of bacteria in agarose.

3 讨论

一般认为抗菌肽 C-端的酰氨化对抗菌肽的抗菌活性很重要^[11], 因此我们设计改造抗菌肽基因时, 在终止密码子之前, 增加了一个天冬酰胺密码子(AAC), 以保证表达出的抗菌肽也具有酰氨化的 C-端。

在甜菜夜蛾中, 类抗菌肽的表达量比在昆虫细胞中高, 可达 80 μ g/mL 虫体血淋巴, 而且经实验证明不是虫体内源性抗菌肽的表达。图 3 表明, 由对照病毒注射而产生内源性抗菌肽的时间曲线与重组抗菌肽表达的时间不同, 内源性抗菌肽仅有很低的量, 最多只有重组抗菌肽表达量的 3%。由免疫反应产生的抗菌肽为一个系列, 在酸性电泳中会出现几个抑菌斑, 而注射重组病毒的虫体只产生一个抑菌斑(图 5)。若构建能同时表达外源基因与多角体蛋白的重组病毒, 可通过经口服感染幼虫的方法避免注射过程的污染。Northern Blotting 分析中甜菜夜蛾感染野生病毒后没有杂交带, 而感染重组病毒后只出现一条杂交带, 说明甜菜夜蛾特异性地表达了抗菌肽。

我们在细胞 sf21 中已表达出类抗菌肽的活性, 但表达量较低, 在甜菜夜蛾虫体中的表达量相对较高。在细胞和虫体不同的表达中表达量有如此显著的差异的原因还不太明确, 可能的原因是: Sf9 对抗菌肽前体的加工不如虫体效率高。抗菌肽在虫体血淋巴中比在培养液中更稳定, 血淋巴中存在各种作用因子, 可能对维持抗菌肽的稳定性有作用。抗

菌肽是小肽, 重组抗菌肽在细胞培养液中易被降解。不论哪种原因, 虫体表达对于抗菌肽来说是较好的选择。抗菌肽在不同的虫体中表达最也有很大差异^[12], 更换表达宿主也会有助于提高表达量。

参 考 文 献

- [1] Boman H G. *Cell*, 1991, **65**: 205 ~ 220.
- [2] Lehrer R I, Ganz T. *Curr Opin Immunol*, 1999, **11**(1): 23 ~ 27.
- [3] 张双全, 屈贤铭, 戚正武. 生物化学杂志, 1987, **3**(1): 11 ~ 18.
- [4] 张双全, 贾红武, 戴祝英. 生物化学与生物物理进展, 1997, **24**(2): 159 ~ 163.
- [5] 郭玉梅, 戴祝英, 胡云龙. 南京师范大学学报(自然科学版), 1985, **18**(1): 62 ~ 67.
- [6] 李秀兰, 戴祝英, 张双全, 等. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, **15**(3): 387 ~ 391.
- [7] Luckow V A, Lec S C, Barry G F. *J Virol*, 1993, **67**: 4566 ~ 4579.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] Hultmark D, Engstrom A, Bannich H. *Eur J Biochem*, 1982, **127**: 207.
- [10] Qu Xian-ming, Steiner H, Engstrom A, et al. *Eur J Biochem*, 1982, **127**: 219.
- [11] Andersons D, Engstrom A, Josephson S, et al. *Biochem J*, 1991, **280**: 219 ~ 224.
- [12] Hellers M, Gunne H, Steiner H. *Eur J Biochem*. 1991, **199**: 435 ~ 439.

EXPRESSION OF THE ARTIFICIAL CECROPIN CMIV-LIKE GENE OF CHINESE SILKWORM *BOMBYX MORI* IN *LAPHYGMA EXIGUA* LARVAE

Zhao Donghong¹ Dai Zhuoying¹ Zhou Kaiya¹ Zhang Linyuan²

(¹ College of Life sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

(² Institute of Nanjing Military Medicine, Nanjing 210012, China)

Abstract: The synthesized CMIV-like Gene was linked with the signal peptide gene of nature silkworm antibacterial peptide and was inserted into baculovirus expression vector pFastBac 1, constructing a recombinant transposing vector. The vector was transformed into DH10Bac competent *E. coli* cells. The recombinant Bacmid was obtained. The recombinant Bacmid was transfected into sf21 cells to get the recombinant virus. *Laphygma exigua* larvae were infected with the recombinant virus to express the antibacterial peptide. The hemolymph were tested to have antibacterial activity. The active antibacterial peptide was purified by acid polyacrylamide electrophoresis. The specific expression of mRNA of CMIV-like Gene was tested using Northern blotting.

Key words: The antibacterial peptide CMIV-like gene, Baculovirus expression system (BES), Bac-to-Bac system, sf21 cell, *Laphygma exigua* larvae

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39670116)