

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1904036 B

(45) 授权公告日 2010.09.01

(21) 申请号 200510112982.4

(22) 申请日 2005.10.18

(73) 专利权人 甘肃亚盛盐化工业集团有限责任公司

地址 730030 甘肃省兰州市城关区张掖路 219 号

(72) 发明人 周长生 陈其新 李春丽 陈正华

(74) 专利代理机构 甘肃省知识产权事务中心 62100

代理人 田玉兰 程萍

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1126760 A, 1996.07.17, 全文.

王来城, 等. 家蝇防御素在大肠杆菌中的表达、纯化与抗体制备. 动物学报 51. 2005, 51(2), 327-333.

Linqi Zhang, et. al. Contribution of Human  $\alpha$ -Defensin 1, 2, and 3 to the Anti-HIV-1 Activity of CD8 Antiviral Factor. Science 298. 2002, 298995-999.

李景鹏, 等. 防御素基因原核表达载体构建及表达. 中国免疫学杂志 20. 2004, 20(7), 459-460.

审查员 王颖

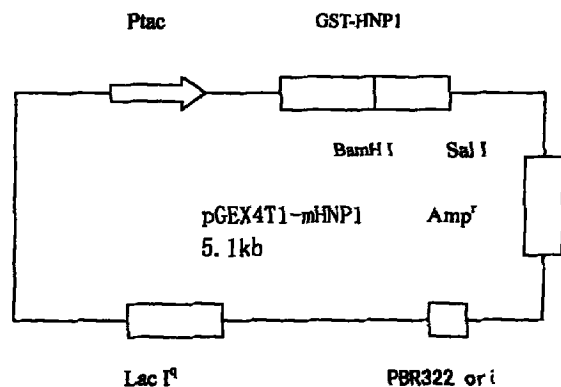
权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 6 页

(54) 发明名称

基因工程菌混合培养生产三种人  $\alpha$  防御素的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种利用转基因大肠杆菌混合培养生产具有生物活性的人  $\alpha$  防御素蛋白的新方法。包括：使用人  $\alpha$  防御素成熟肽优化编码序列，将该序列构建到适宜的 tac 型表达载体 pGEX4T1 中，再将其转化入筛选出的抗细胞毒性的大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 中，从而构建成含外源基因的三种工程菌株 PHS1、PHS2、PHS3。它们的特点是均能抵抗表达蛋白对细胞的毒性，从而使表达量显著提高。将三种工程菌进行等量混合培养，经化学诱导表达人  $\alpha$  防御素，可同时生产出三种人  $\alpha$  防御素蛋白的混合蛋白。用上述方法生产的蛋白可能对病原菌的抗性具有协同的作用。用本法生产  $\alpha$  防御素可应用于医药卫生领域。



1. 一种利用转基因大肠杆菌混合培养生产具有生物活性人  $\alpha$  防御素蛋白的方法,其中包括:使用人  $\alpha$  防御素成熟肽优化编码序列 mHNP1、mHNP2 和 mHNP3,分别将所述三序列构建到适宜的 tac 型表达载体 pGEX4T1 中,再分别将构建的表达载体转入到筛选出的抗细胞毒性的大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 中,从而得到含外源基因的三种工程菌株 PHS1、PHS2 和 PHS3,最后将获得的三种工程菌株混合培养来生产人  $\alpha$  防御素蛋白,其中, mHNP1、mHNP2、mHNP3 序列分别为:

mHNP1:

```
1GCC TGC TAT TGC CGT ATT CCA GCC TGC ATT GCA GGC GAA
40CGT CGT TAT GGC ACC TGC ATC TAC CAG GGC CGT CTC TGG
79GCA TTC TGC TGC
```

mHNP2:

```
1TGC TAT TGC CGT ATT CCA GCC TGC ATT GCA GGC GAA
40CGT CGT TAT GGC ACC TGC ATC TAC CAG GGC CGT CTC TGG
79GCA TTC TGC TGC
```

mHNP3:

```
1GAC TGC TAT TGC CGT ATT CCA GCC TGC ATT GCA GGC GAA
40CGT CGT TAT GGC ACC TGC ATC TAC CAG GGC CGT CTC TGG
79GCA TTC TGC TGC。
```

2. 将权利要求 1 所述序列 mHNP1、mHNP2 和 mHNP3 分别构建到筛选出的抗细胞毒性的 tac 型原核表达载体 pGEX4T1 中所获得的重组表达质粒 pGEX4T1-mHNP1、pGEX4T1-mHNP2 和 pGEX4T1-mHNP3。

3. 将权利要求 2 所述的 pGEX4T1-mHNP1、pGEX4T1-mHNP2 和 pGEX4T1-mHNP3 分别转入到抗细胞毒性的大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 中所获得的三种工程菌株 PHS1、PHS2 和 PHS3,它们的特点是能抵抗表达蛋白对细胞的毒性,从而使表达量提高。

## 基因工程菌混合培养生产三种人 $\alpha$ 防御素的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用基因工程菌混合培养生产人  $\alpha$  防御素的方法,即将经过基因修饰的人  $\alpha$  防御素 (Human neutrophil peptides, HNP) 1、2、3 成熟肽编码序列插入融合性原核表达载体,转化大肠杆菌,获得三种转基因工程菌,在混合培养体系中生产三种人  $\alpha$  防御素蛋白混合物。本发明提供用于本发明的方法及适用的工程菌。

### 背景技术

[0002] 防御素是普遍存在于高等生物体中的一种微生物抗生肽,对病原微生物具有广谱的毒杀效应,是机体免疫防御系统的重要组成部分 (Ganc T et al, Eur J Haematol, 1990, 44 :1 ;张满朝, 国外医学分子生物学分册, 1994, 68 :70)。防御素主要由哺乳动物体内参与非特异性免疫的一些吞噬细胞,特别是嗜中性粒细胞 (PMN) 产生的,其它细胞包括 NK 细胞、 $\gamma \delta$  细胞、B 细胞和单核 / 巨噬细胞及某些上皮细胞也能产生此类物质。成熟防御素是分子量为 3 ~ 4KD 的非糖基多肽,一般由 29 ~ 34 个氨基酸组成,分子内的 3 个二硫键使防御素具有稳定的  $\beta$  - 片层结构,在防御素分子间,通过疏水键和氢键的相互作用形成二聚体。目前对防御素的抑菌机理尚无定论。普遍认为,防御素的细胞毒活性和抗微生物活性与其结构特点有关,带正电的防御素与带负电的细菌细胞膜相互吸引,二聚或多聚的防御素穿膜形成跨膜的离子通道,从而扰乱了细胞膜的通透性及细胞能量状态,导致细胞膜去极化,呼吸作用受到抑制以及细胞 ATP 含量下降,最终使靶细胞死亡。防御素的抗病毒作用则是通过与病毒外壳蛋白结合而导致病毒失去生物活性 (Lehrer RI et al, Annu rev Immun, 1993, 11 :105 ;Lehrer RI et al, J Clin Invest, 1989, 84 :553)。由于这种特殊的作用机理,使防御素具备两个特点:一是抗性谱广,二是目的微生物难以对其产生抗性突变。因此,科学家们对防御素应用前景十分看好。

[0003] 防御素在人体内广泛分布,包括  $\alpha$  防御素  $\beta$  防御素两类。已发现的  $\alpha$  防御素有 6 种之多,有关基因结构已经基本清楚 (Sparkes RS et al, Genomic, 1989, 5 :240)。早在 1993 年,日本科学家就报道防御素在离体情况下可抑制艾滋病毒的复制,但没有证明在体内防御素仍然有效 (Nakashima H et al, AIDS, 1993, 7 :1129)。1986 年,科学家们观察到人体免疫细胞 CD8 分泌一些可抑制艾滋病病毒复制的未知因子 (Walker CM et al, Science, 1986, 234 :1563)。近来,张林琦等在正常人群和感染 HIV 1 的长期生存者来源 CD8+T 淋巴细胞刺激培养液中发现了一族有 2 个或 3 个峰的分子,分子量分别为 3371. 9Da、3442. 5Da 和 3486. 5Da。用单克隆抗体识别技术及直接蛋白序列分析技术,最终确定这些小分子是人  $\alpha$  防御素 1、2 和 3。这些小分子只能在正常对照和长期生存者中被检测到,在处于进展状态的 HIV 1 感染者的刺激培养液中没有发现  $\alpha$  防御素。实验还证实人工合成  $\alpha$  防御素 1 和 2 的混合物 (1 : 1) 也对 HIV-1 病毒具有显著的抑制效应 (Zhang et al, science, 2002, 298 :995)。张林琦等的研究揭示了为什么少数感染艾滋病毒的人 (约占感染者总数的 1% -2%) 可以自然存活多年不发病的秘密,同时也提示人三种人  $\alpha$  防御素可能具有重要的协同作用。

[0004] 人  $\alpha$  防御素 1、2 和 3 的发现和证实,使科学家在了解 HIV/AIDS 的发病机制方面迈出了一大步。但要想将防御素真正应用于艾滋病治疗,尚有很多工作要做。从人体内提纯的天然防御素具有很强的抗病毒活性,但提取资源有限,成本昂贵。化学合成法虽可方便地对多肽进行修饰,但也存在成本过高的问题。现已获得两个商业化的产品  $\alpha$  防御素 1 和  $\alpha$  防御素 2,但合成工艺复杂,且与天然提纯品相比纯度不够,包含了许多杂蛋白,抗艾滋病病毒活性较低,仅为提纯的天然防御素的 1/10 至 1/20 (Zhang et al, science, 2002, 298 : 995)。因此,通过基因和蛋白质工程技术来改善生产效率和产物活性,已成为防御素研究和应用的关键。

[0005] 防御素在基因工程领域的应用主要表现在两方面:一是研究出高效的细菌或酵母表达系统,大量生产防御素,应用于医学领域;另一个方面是分离动物或昆虫的防御素基因,将之应用于植物抗病基因工程中(傅荣昭等,高技术通讯,1996,3:61)。截止目前,孙勇如等已经分离出兔防御素基因(科学通报,1998,43:1519),将兔  $\alpha$  防御素基因导入小球藻,从转基因小球藻中获得了有活性的兔防御素 NP 1,解决了藻类基因工程表达(专利申请号 971123446,公开号 CN1203278A;专利申请号 71121893,公开号 CN1203277A)。但目前国内外均尚无应用大肠杆菌系统生产人  $\alpha$  防御素的成功报道。1993 年, Piers 等曾将 HNP1、昆虫杀菌肽 cecropin/melittin (CEME) 杂合肽基因分别与 4 个不同的载体蛋白相融合,并在 *S. aureus* 中进行表达;对表达产物的产量、细胞定位、蛋白降解情况进行了较为系统的研究,但遗憾的是没得到具有抗菌活性的 HNP1 蛋白 (Piers et al, gene, 1993, 134 : 7; 孙超等,多肽抗生素研究进展, <http://www.21ray.com/6-tech/10.html>)。因此,生产防御素的大肠杆菌高效表达体系还有待于进一步研究。

[0006] 大肠杆菌表达系统是基因表达技术中发展最早、目前应用广泛的经典表达系统。自二十世纪七十年代中期 Struhl 等首次在大肠杆菌中实现了有功能的活性表达以来,以质粒、乳糖操纵子为基础建立的大肠杆菌表达体系不断得到发展和完善。与其他系统相比,大肠杆菌表达系统具有遗传背景清楚,目标基因表达水平高,培养周期短,抗污染能力强等特点,因而成为分子生物学研究和生物技术产业化进程中的重要工具(李育阳等,基因表达技术,科学出版社,2001,1-13)。

[0007] 防御素对大肠杆菌细胞的毒性以及表达产物的活性问题是限制其在原核表达系统表达成功的主要原因。人  $\alpha$  防御素在其体内以特殊的机制避免对产生它的细胞本身的损伤。 $\alpha$  防御素是先合成前原蛋白,暂时封闭其细胞毒性 (Erika V et al, J Clin Invest, 1996, 97 : 1624)。另外,成熟的防御素是在嗜天青颗粒中形成,并且很少向外分泌,即使向外分泌,也被胞间液稀释或与其它蛋白结合,从而不表现细胞毒活性。但如同其它多肽抗生素一样,要用大肠杆菌表达系统来生产这些蛋白就比较困难。由于目标蛋白对宿主本身产生杀灭作用,往往造成表达体系表达量低甚至无表达。因此,抑制或克服目标蛋白对大肠杆菌本身毒性就成为首要面对的问题。

[0008] 采用适宜表达方式以及选择适宜的细菌株系构建工程菌是克服目标蛋白毒性以及成功应用大肠杆菌系统生产人  $\alpha$  防御素最重要的方面。对分子量较小且产物有细胞毒性的目标基因进行融合表达或串联聚合表达是比较理想的方式。完整的表达系统由表达载体和宿主菌两部分构成。目前比较成熟的大肠杆菌表达系统包括 lac 和 tac 表达系统、PL 和 PR 表达系统、T7 表达系统等。T7 系统以 Novagen 公司的 pET 系列载体以及相应的宿主

菌 (BL21 系列) 为代表 (Robert Mierdorf et al, Newsletter of Novagen, 1994, 1:1-4), 这类表达系统所用的载体具有可诱导的 T7 启动子, 系统表达量高 (可占细菌总蛋白的 25% 以上), 常用 6 ~ 10 个组氨酸形成融合蛋白, 只增加几个氨基酸, 对蛋白质结构影响较小, 但是往往本底表达 (也称渗漏表达) 水平较高, 和一般菌株匹配不适宜毒性蛋白表达。与 pET 系列载体匹配的宿主菌主要是 BL21 系列, 包括 BL21、BL21 (DE3)、BL21TrxB、BL21 (DE3) pLysS、BL21 (DE3) pLysE 等。BL21 系列菌株具有 lon 和 ompT 蛋白水解酶缺陷的优点, 可提高表达蛋白的稳定性。其中 BL21 (DE3) pLysS 带有质粒 pLysS, 能编码 T7 溶酶。T7 溶酶可降低 T7 启动子调控的目的基因的本底表达水平, 但不干扰由 IPTG 诱导的表达水平, 适宜毒性蛋白表达。PL 和 PR 表达系统则是以温度敏感性 PL 和 PR 启动子为中心构建的表达系统, 成本低廉, 但是表达蛋白容易降解, 表达量低, 不适宜毒性蛋白表达。lac 和 tac 表达系统以 Amersham 公司的 pGEX 系列载体为代表, 在 tac 启动子、Lac 操纵基因及 SD 序列下游相继是谷胱甘肽巯基转移酶 (Glutathione S-transferase Gene Fusion, GST) 基因序列以及多克隆位点。克隆的外源基因与 GST 基因相连, 表达产物为 GST 融合蛋白。带有 GST 标签的载体选择了大肠杆菌偏爱的密码子, 容易表达毒性外源蛋白, 并且纯化方便。GST 基因序列存在可避免 mRNA 复杂二级结构的出现, 增加转录物稳定性。因此, GST 的存在有利于克服因细胞异源蛋白对宿主细胞本身杀灭而致的低效表达或无表达现象。另外, GST 属于多功能蛋白, 有助于稳定重组蛋白的折叠, 可在温和条件下除去, 不易破坏目标蛋白的功能及其抗原性 (The Recombinant ProteinBook, Amersham, www. apbiotech. com) (Pickett C B, et al, Ann Rev Biochem, 1989, 58:743)。BL21 系列菌株也适用于这类载体。

[0009] 改善表达产物的活性是利用工程菌成功生产药用蛋白的另一重要方面。以包涵体形式表达目标蛋白产量一般较高, 但是融合蛋白复性艰难, 活性产物得率很低。因此, 在胞内直接表达有生物活性的蛋白质具有重要意义。虽然包涵体形成的理化因素仍然不清楚, 但通过低温培养、培养基适宜 PH 值的选择及在培养体系中添加一些提高渗透压的物质等措施都能有助于形成有活性的蛋白质。例如, Yumiko Shirano 等在 37°C 培养条件下诱导表达 3 小时, 得到没有活性的 Lipoxygenase, 但在 15°C 条件下诱导 16 小时, 得到了有活性的可溶蛋白 (FEBS Letters, 1990, 295:10)。25 ~ 30°C 是常用的培养温度, 在此温度下细菌生长缓慢, 溶氧水平较高, 太低温度则会使降温成本提高。另外, 有报道在有甜菜碱的条件下高渗透压有利于形成可溶的有活性蛋白质。

[0010] 目前, 应用大肠杆菌系统生产真核来源药用蛋白已取得了很大进展。据报道, 国际上已批准的重组蛋白药物中有 34 种采用该系统生产, 在我国已用该系统生产人生长素、胰岛素、人组织型纤维酶原激活剂、白介素等。国内关于人  $\alpha$  防御素的研究也已取得了一些进展。李景鹏等通过化学合成途径获得了人  $\alpha$  防御素 cDNA 克隆 (东北农业大学学报, 1995, 26:383), 刘水平等也克隆了人类防御素基因 cDNA 片段 (湖南医科大学学报, 2002, 27:17), 但是, 目前以大肠杆菌系统为工具生产人  $\alpha$  防御素, 特别是协同生产三种防御素的技术尚未见报道。

## 发明内容

[0011] 本发明的目的是提供一种利用转基因大肠杆菌混合培养协同生产人  $\alpha$  防御素蛋白的方法, 包括用于该方法的适宜工程菌, 系统部件组合以及主要技术路线。

[0012] 本发明提供的利用转基因大肠杆菌混合培养生产人  $\alpha$  防御素蛋白的方法包括以下步骤：

[0013] 1. 使用由人  $\alpha$  防御素成熟肽编码序列经优化后, 化学合成获得的是 mHNP1、mHNP2、mHNP3 序列

[0014] mHNP1

[0015] 1 GCC TGC TAT TGC CGT ATT CCA GCC TGC ATT GCA GGC GAA

[0016] 40 CGT CGT TAT GGC ACC TGC ATC TAC CAG GGC CGT CTC TGG

[0017] 79 GCA TTC TGC TGC

[0018] mHNP2

[0019] 1 TGC TAT TGC CGT ATT CCA GCC TGC ATT GCA GGC GAA

[0020] 40 CGT CGT TAT GGC ACC TGC ATC TAC CAG GGC CGT CTC TGG

[0021] 79 GCA TTC TGC TGC

[0022] mHNP3

[0023] 1 GAC TGC TAT TGC CGT ATT CCA GCC TGC ATT GCA GGC GAA

[0024] 40 CGT CGT TAT GGC ACC TGC ATC TAC CAG GGC CGT CTC TGG

[0025] 79 GCA TTC TGC TGC

[0026] 2. 将 mHNP1、mHNP2、mHNP3 成熟肽编码序列构建到筛选出的抗细胞毒性的 tac 型原核表达载体 pGEX4T1 中, 构建重组表达质粒分别为 pGEX4T1-mHNP1、pGEX4T1-mHNP2、pGEX4T1-mHNP3 (见图 1、图 2、图 3)。

[0027] 3. 将上述重组质粒分别转化大肠杆菌细胞 BL21 (DE3) pLysS, 构建成 mHNP 生产工程菌 PHS1、PHS2、PHS3 ;

[0028] 4. 将三种工程菌等量混合, 在低温条件下化学诱导混合工程菌表达异源蛋白。它们的特点是能抵抗表达蛋白对细胞的毒性, 从而使表达量显著提高。

[0029] 5. 三种工程菌进行等量混合培养, 经化学物质异丙基硫代半乳糖苷的诱导表达人  $\alpha$  防御素, 可同时生产出三种接近天然的人  $\alpha$  防御素蛋白的混合蛋白。

[0030] 6.  $\alpha$  防御素蛋白的混合蛋白, 可能对病原菌的抗性具有协同的作用, 这种人  $\alpha$  防御素可应用于医药卫生领域。

[0031] 本发明所使用的 DNA 序列是依据已知三种人  $\alpha$  防御素 mRNA 序列及氨基酸组成 (Zhang et al, science, 2002, 298 :995), 经基因优化设计而来, 可翻译出正确的人  $\alpha$  防御素 1 氨基酸序列。这种经过修饰的序列用大肠杆菌喜好密码子替换了原序列中的稀有密码子, 具有更高的翻译效率。除添加起始密码子 ATG 外, 在三种改造 DNA 序列中还使用了包括大肠杆菌常用终止密码子 TAA 在内的双终止子, 并配置了有利终止的侧翼序列, TAAG 的序列格式将最大限度地防止不良终止效应的发生, 为高效表达奠定基础。

[0032] 本发明在基因修饰和反复筛选的基础上, 选择带有 tac 启动子和 GST 标签序列的原核类表达载体 (pGEX 系列载体, Amersham 公司产品), 将优化了的基因序列 GST 基因序列之后 BamHI 和 SalI 位点之间, 从而构建了高效融合性表达载体。这种构建方式利用了 tac 启动子的高效性, GST 基因对目标蛋白基因转录物的稳定作用以及对目标蛋白活性暂时的“封闭性”, 一定程度上抑制和克服了目标蛋白对大肠杆菌细胞本身的毒害作用, 使以大肠杆菌为工具进行人防御素生产成为可能。表达的任何蛋白质可经凝血酶切处理, 获得单纯

的目标蛋白。

[0033] 本方法将获得的重组蛋白表达质粒转化入大肠杆菌宿主菌 BL21 (DE3) pLysS 内, 组成完整的大肠杆菌表达系统。lon 和 ompT 蛋白水解酶缺陷型菌株的使用保证了翻译蛋白的稳定性, BL21 (DE3) pLysS 菌株可能降低本底转录水平, 抑制了异源蛋白对宿主细胞的毒害作用, 利于人防御素基因的表达。

[0034] 本方法将三种可编码人  $\alpha$  防御素的工程菌混合在一起, 在混合培养体系中化学诱导同时表达三种人  $\alpha$  防御素蛋白。这些化学物质包括异丙基硫代半乳糖苷 (Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranoside, IPTG)、乳糖等。IPTG 诱导效率高, 可满足抗体制备、生化性质研究、结构研究等需要, 而乳糖诱导法以其安全性适宜于制备用于医疗目的重组人防御素。

[0035] 本发明首次提供了一种利用基因工程菌生产人  $\alpha$  防御素混合物的方法, 并提供了适宜该方法的转基因工程菌。与目前应用的化学合成、人工提取人防御素以及藻类生产动物防御素的技术相比, 具有如下的优点:

[0036] (1) 本法提供的转基因工程菌构建过程经过优化筛选, 系统结构完好, 表达效率高。产物容易加工提纯, 开发周期短, 适宜于发酵大规模生产。

[0037] (2) 利用本法可一次性生产三种人  $\alpha$  防御素, 有利于发挥三种同源蛋白的协调作用, 较单一防御素蛋白更适宜于医学研究或临床应用。

[0038] (3) 本法提供技术产品为人体活性多肽, 应用于医学领域时毒副作用可能性小, 安全, 不易发生人体免疫应答反应及因此而导致的药效降低等现象。

[0039] 本发明首次提供了应用基因工程菌同时生产三种人  $\alpha$  防御素的技术方法, 通过低温诱导、融合表达方式生产出了有活性的人防御素, 为  $\alpha$  防御素的基因工程生产提供了新的途径, 将能在一定程度上解决人防御素蛋白来源不足的现状。研究成果可满足生产人防御素生化性质以及制备相应抗体等研究应用的需要, 也使人防御素的药用开发和规模生产成为可能。新型药物的大规模生产为目前难以医治的疾病得以有效治疗, 特别是对艾滋病的控制和治疗提供了新的思路和方法。

## 附图说明

[0040] 图 1 pGEX4T1-mHNP1

[0041] 图 2 pGEX4T1-mHNP2

[0042] 图 3 pGEX4T1-mHNP1

[0043] 图 4 mHNP1 片段合成示意图

[0044] F1、F2 为正义链片段, F3、F4 为反义链片段。

[0045] 正义链片段和反义链片段相互错位交搭。

[0046] 图 5 pUCm T-mHNP1 阳性克隆 PCR 鉴定。

[0047] 1-5 及 7-10 : 均为阳性菌落。

[0048] 6 : DNA marker ;

[0049] 图 6 pGEX4T1 载体图谱

[0050] 图 7 pGEX4T1-mHNP1 重组菌落 PCR 鉴定。

[0051] 1-5, 7, 9-10 : 阳性菌落

- [0052] 6 :DNA marker,
- [0053] 8 :假阳性菌落
- [0054] 图 8 由 P2、P4 引物扩增出的 HNP2 片段
- [0055] 1 :DNA marker ;2-7 :PCR 样本
- [0056] 图 9 pGEX4T1-mHNP2 重组菌落 PCR 鉴定
- [0057] 1-4 :阳性菌落,5 :DNA marker
- [0058] 图 10 由 P3、P4 引物扩增出的 mHNP3 片段
- [0059] 1-4 :PCR 样本号,5 :DNA marker
- [0060] 图 11 pGEX-mHNP3 工程菌 PCR 鉴定
- [0061] 1-4 :阳性菌落,5 :DNA marker
- [0062] 图 12 15% SDS-PAGE 鉴定人  $\alpha$  防御素基因工程菌菌体中目的蛋白表达
- [0063] 1,未诱导转基因菌 2h ;2,诱导转基因菌 2h ;3,未诱导转基因菌 4h ;4,蛋白标准 ;5,诱导转基因菌 4h ;6,未诱导转基因菌 6h ;7,诱导转基因菌 6h ;8,诱导空载菌 6h ;9,未诱导空载菌 6h。
- [0064] 图 13 混合培养体系中诱导表达 mHNP 蛋白对大肠杆菌生长的影响
- [0065] uninduced sample :未诱导转基因工程菌样本,induced sample :诱导转基因工程菌样本,
- [0066] free-loaded control :空载对照菌。
- [0067] 图 14 提纯 mHNP 蛋白的抗菌活性鉴定
- [0068] Sa :*Staphylococcus aureus*,金黄色葡萄球菌 ;
- [0069] E coli j :*E. coli* BL21 (DE3),大肠杆菌 BL21 (DE3)。

## 具体实施方式

- [0070] 实施例 1 :人  $\alpha$  防御素基因工程菌的制备
- [0071] 1、 $\alpha$  防御素 (HNP) 成熟肽编码序列优化设计与化学合成
- [0072] 从 Genbank 中查询得知 HNP1 和 HNP2 mRNA 序列 (NM\_004084)、HNP3 mRNA 序列 (NM\_005217) 以及 HNP1 和 HNP2 成熟肽氨基酸序列 (P59665)、HNP3 成熟肽氨基酸序列 (P59666),HNP1、HNP2、HNP3 成熟肽编码序列仅有个别碱基序列的差异 (见表 1,斜体表示),即 HNP1 前三个碱基为编码甘氨酸的 GCC,而 HNP2 缺少此氨基酸,HNP3 序列第一个密码子是编码天冬氨酸的 GAC。因此,先合成一个肽的编码序列,其它的序列通过 PCR 方法扩增获得。
- [0073] 表 1 GENBANK 中 HNP1、HNP2 和 HNP3 成熟肽的编码序列
- [0074]



HNP1	1	<b>GCC</b> TGC TAT TGC AGA ATA CCA GCG TGC ATT GCA GGA GAA
	40	CGT CGC TAT GGA ACC TGC ATC TAC CAG GGA AGA CTC TGG
	79	GCA TTC TGC TGC
HNP2	1	TGC TAT TGC AGA ATA CCA GCG TGC ATT GCA GGA GAA
	40	CGT CGC TAT GGA ACC TGC ATC TAC CAG GGA AGA CTC TGG
	79	GCA TTC TGC TGC
HNP3	1	<b>GAC</b> TGC TAT TGC AGA ATA CCA GCG TGC ATT GCA GGA GAA
	40	CGT CGC TAT GGA ACC TGC ATC TAC CAG GGA AGA CTC TGG
	79	GCA TTC TGC TGC

[0075] 通过序列分析,根据不同生物喜好密码子及其稀有密码子的差异性,对原序列进行修饰改造。即剔除 HNP 中稀有密码子,将它们替换为大肠杆菌喜好密码子。为达到良好的翻译终止效果,添加了 TGA 和 TAA 两个终止密码子,利于目的蛋白在大肠杆菌表达。修饰后 HNP1 序列见表 2。

[0076] 表 2 HNP1 成熟肽原编码序列及重新设计修饰的序列

[0077]

GENBANK 中 原编码序列 (HNP1)	1	GCC TGC TAT TGC AGA ATA CCA GCG TGC ATT
	31	GCA GGA GAA CGT CGC TAT GGA ACC TGC ATC
	61	TAC CAG GGA AGA CTC TGG GCA TTC TGC TGC
重新设计序列 (mHNP1)	1	GCC TGC TAT TGC <b>CGT ATT</b> CCA <b>GCC</b> TGC ATT
	31	GCA <b>GGC</b> GAA CGT <b>CGT</b> TAT <b>GGC</b> ACC TGC ATC
	61	TAC CAG <b>GGC CGT</b> CTC TGG GCA TTC TGC TGC

[0078] 表中斜线部分为替换了的密码子

[0079] 表 3 mHNP1 寡核苷酸片段的设计

[0080]

有义链	F1 (42bp):	5' GCC TGC TAT TGC CGT ATT CCA GCC TGC ATT GCA GGC GAA CGT 3'
	F2(48b):	5' CGT TAT GGC ACC TGC ATC TAC CAG GGC CGT CTC TGG GCA TTC TGC TGC 3'
反义链	F3 (36b):	3' ACG TAG ATG GTC CCG GCA GAG ACC CGT AAG ACG ACG 5'
	F4 (54b):	3' CGG ACG ATA ACG GCA TAA GGT CGG ACG TAA CGT CCG CTT GCA GCA ATA CCG TGG 5'

[0081] 将重新设计的 HNP1 成熟肽编码序列(以下简称 mHNP1)两条互补链分成 4 个片段(F1-F4),互补片段之间相互交搭。交由上海生工生物技术公司,用亚磷酸胺法,分别予以合成上述片段(见表 3 及图 4)。检测纯化后分装, -20℃ 备用。

[0082] 合成上述片段后,先对 F2、F4 两片段进行 5' 端磷酸化。即取 F2 片段和 F4 各 200pm, T<sub>4</sub> 多核苷酸激酶 40u, 10mmol/L ATP5ul, 10ul 10 倍缓冲液 [500mM Tris-HCl (PH 8.0),

100mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM DTT], 加水补足 100u1 体积, 37°C 反应 2 小时, 80°C 10min 后渐冷至室温, 用酚液 (酚: 氯仿: 异戊醇 = 25 : 24 : 1) 抽提, 100% 和 70% 乙醇沉淀, 溶于 20u1 TE 中。

[0083] 对 F2 和 F4 片段 5' 端磷酸化处理, 进行 4 片段 (F1-F4) 连接反应。将 4 个片段各 200pm, 用 100u1 连接酶缓冲液溶解在一小管中, 其中 F2 和 F4 已磷酸化, 80°C 2min 后渐冷至室温, 加入 40u1 T4 DNA 连接酶, 12°C 反应 24h, 连接产物用酚液和乙醇抽提处理。将所得样品加入 1.0% 琼脂糖点样孔内, 同时加入 DNA marker, 60 ~ 80V 电泳, 紫外透射仪下检测, 切下目的条带凝胶, 用北京赛百盛基因技术有限公司 Ultrapure™ PCR 产物纯化回收试剂盒回收。最后溶解于 20u1 TE 中保存, 并命名为 mHNP1。

[0084] 2、合成 HNP1 序列的克隆

[0085] • (1) 载体及菌种:

[0086] pUCm-T 克隆载体购自上海生工公司。大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存。

[0087] • (2) 工具酶、marker 及试剂盒:

[0088] Taq 酶、X-gal、IPTG、dNTP、DNA marker 购自北京鼎国生物技术有限责任公司。BamHI、SalI 等限制性内切酶、DNA Ligase 购自大连宝生物工程公司, Ultrapure™ PCR 产物纯化回收试剂盒由北京赛百盛生物工程公司提供, PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。测序由上海申友公司完成。

[0089] (3) mHNP1 的引物

[0090] 以步骤 1 中设计的 mHNP1 序列为模板, 利用 Oligo6.0 软件设计如下一对引物 (P1 和 P4):

[0091] P1 5' GCG GGA TCC *ATG* GCC TGC TAT TGC CGT ATT C 3'

[0092] BamH I

[0093] P4 5' CGC GTC GAC *TTA TCA* GCA GCA GAA TGC CCA G 3'

[0094] Sal I

[0095] 下划线部分为酶切位点, 斜体为起始密码子或终止密码子。交由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

[0096] (4) 回收 PCR 扩增产物, 连接到 T 载体上

[0097] 以步骤 1 化学合成后连接的 mHNP1 为模板, 经 P1、P4 引物对扩增, PCR 在 Flexigene PCR 仪 [Techne (Cambridge) Ltd 生产] 上进行, 50u1 反应体系: Taq 酶 1.0u1 (2u/u1), dNTPs (各 10mM) 4.0u1, 10 倍反应缓冲液 5.0u1 [200mM Tris-HCl (PH 9.0), 500mM KCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100], 双端引物 (F1 和 F4) 各 2.0u1, 模板 (mHNP1) (约含 1ng DNA) 2.0u1, 剩余体积用灭菌双蒸水补足。反应条件为: 95°C 预变性 1min, 然后 94°C 变性 30s, 55°C 30s, 72°C 延伸 1min, 共 30 个循环, 最后延伸 10min 补齐末端。

[0098] 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 约为 110bp, 用回收试剂盒纯化回收 PCR 产物, 与 pUCm T 载体进行连接。10u1 连接反应体系组成为: T<sub>4</sub> DNA 连接酶 1u1, 回收 PCR 产物 5u1 (约 0.2pmol), pUCm T 载体 1u1, 10 倍 T4 连接酶缓冲液 1u1 [660mM Tris-HCl (PH 7.6), 66mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM DTT, 1mM ATP], PEG4000 1u1, 灭菌水 1u1。16°C, 过夜连接。产物命名为 pUCmT-mHNP1。

[0099] 按照《分子克隆》(J. 萨姆布鲁克等著, 黄培堂等译。分子克隆实验指南 (第三版)。科学出版社, 2002, p96) 中的方法制备 DH5 α 感受态细胞, 按常规热激法将上述连接液转化

大肠杆菌 DH5  $\alpha$ 。即将连接液 8 $\mu$ l 加入放置在冰浴上至刚融化的 DH5  $\alpha$  感受态细胞 200 $\mu$ l 中,冰浴 30min,然后在 42 $^{\circ}$ C 恒温水浴中精确热激 90s,立即取出置于冰浴 2min,加入不含任何抗生素的 LB 培养液,37 $^{\circ}$ C 温浴 45min 使细菌复苏并表达抗生素抗性基因。最后将转化菌液涂在含 X-gal 和 IPTG 的氨苄琼脂平板上,培养过夜。

[0100] 次日进行蓝白斑初步筛选。阳性菌落筛选程序是:从转化皿中挑取白斑多个(20个),另选少量蓝斑(3个)做对照,接种于含 3ml 氨苄的 LB 培养液过夜。次日提取质粒,以蓝斑质粒为对照在白斑质粒中挑选电泳条带大小适合的滞后者,再进行 PCR 扩增(图 5)、BamH I 和 SaI I 双酶切检测,均得到预计的约 100bp 的 DNA 片段。最后,挑选一个上述各步鉴定正确的菌落送上海申友公司测序。

[0101] 序列分析结果表明,克隆中有预期的 HNP1 编码序列及终止密码子侧翼序列:

[0102] 1 GCG GGA TCC ATG GCC TGC TAT TGC CGT ATT

[0103] 31 CCA GCC TGC ATT GCA GGC GAA CGT CGT TAT

[0104] 61 GGC ACC TGC ATC TAC CAG GGC CGT CTC TGG

[0105] 91 GCA TTC TGC TGC TGA TAA GTC GAC GCG

[0106] 将获得的克隆 pUCm T-mHNP1 质粒做甘油菌 -70 $^{\circ}$ C 保存。

[0107] 3、HNP1 表达基因工程菌 (PHS1) 的制备

[0108] • (1) 载体及菌种:

[0109] 重组质粒 pUCm-T/HNP1 重组质粒;大肠杆菌 BL21 (DE3)pLysS、tac 启动子载体 pGEX4T1 (Amersham 公司产品,质粒图谱见图 6) 由东南大学医学院曾宪坤博士惠赠。

[0110] • (2) 工具酶、marker 及试剂盒:

[0111] DNA marker 购自北京鼎国生物技术有限责任公司。BamHI、SaII 等限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自大连宝生物工程公司, Ultrapure<sup>TM</sup>PCR 产物纯化回收试剂盒由北京赛百盛生物工程公司提供, PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。Molecularweight markers proteins kit(pharmacia 17-0446-01),购自北京新经科生物技术有限公司。

[0112] (3) 构建质粒 pGEX4T1-mHNP1

[0113] 用 BamHI、SaII 酶切已经鉴定的 pUCmT-mHNP1 重组质粒,酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,用赛百盛 Ultrapure<sup>TM</sup> PCR 产物纯化回收小片段即 mHNP 1 片段。用 BamHI、SaII 酶切 pEGX4T1,线性化的载体片段分别与回收的 mHNP 1 片段在 T<sub>4</sub>DNA 连接酶作用下 16 $^{\circ}$ C 过夜,获得质粒 pGEX4T1-mHNP1。

[0114] 连接产物转化大肠杆菌 BL21 (DE3)pLysS 感受态细胞。挑取转化菌落摇动培养,抽提质粒后 PCR 扩增(图 7)、BamHI 和 SaII 双酶切鉴定,并进行序列测定,鉴定正确后,将该转化菌命名为 PHS1。

[0115] 4、HNP2 和 HNP3 表达基因工程菌 (PHS2 和 PHS3) 的制备

[0116] • 在对 HNP1 成熟肽编码序列进行优化设计的基础上,通过 PCR 技术对 HNP2、HNP3 成熟肽编码序列也做相似的修饰。修饰后 HNP2 和 HNP3 成熟肽编码序列(以下分别简称 mHNP2、mHNP3) 与原序列差异如下表。

[0117] 表 4 mHNP2、mHNP3 与相应的成熟肽原编码序列比较

[0118]

mHNP2		GENBANK 中 HNP2 成熟肽原编码序列	
1	TGC TAT TGC <b>CGT ATT</b> CCA	1	TGC TAT TGC AGA ATA CCA
19	GCC TGC ATT GCA <b>GGC</b> GAA	19	GCG TGC ATT GCA GGA GAA
37	CGT <b>CGT</b> TAT <b>GGC</b> ACC TGC	37	CGT CGC TAT GGA ACC TGC
55	ATC TAC CAG <b>GGC CGT</b> CTC	55	ATC TAC CAG GGA AGA CTC
73	TGG GCA TTC TGC TGC	73	TGG GCA TTC TGC TGC
mHNP3		GENBANK 中 HNP3 成熟肽原编码序列	
1	GAC TGC TAT TGC <b>CGT ATT</b>	1	GAC TGC TAT TGC AGA ATA
19	CCA <b>GCC</b> TGC ATT GCA <b>GGC</b>	19	CCA GCG TGC ATT GCA GGA
37	GAA CGT <b>CGT</b> TAT <b>GGC</b> ACC	37	GAA CGT CGC TAT GGA ACC
55	TGC ATC TAC CAG <b>GGC CGT</b>	55	TGC ATC TAC CAG GGA AGA
73	CTC TGG GCA TTC TGC TGC	73	CTC TGG GCA TTC TGC TGC

[0119] 表中斜线部分为替换了的密码子

[0120] (1) 菌种与质粒：

[0121] 大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS、p GEX4T1 载体 (Amersham 产品) 均为东南大学医院院遗传中心曾宪坤博士惠赠。

[0122] • (2) 工具酶及试剂：

[0123] 限制性内切酶、T<sub>4</sub>DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶分别购自大连宝生物工程公司、上海生工公司、北京鼎国生物技术有限责任公司。

[0124] • (3) 引物的设计与合成：

[0125] 分别以 mHNP2 和 mHNP2 为模板设计两对三条 PCR 引物 (即 P2-P4, P3-P4), 均由宝生物公司合成。引物序列如下：

[0126] P2 5' GCG GGA TCC ATG TGC TAT TGC CGT ATT CCA G 3'

[0127] P3 5' GCG GGA TCC *ATG* GAC TGC TAT TGC CGT ATT CC 3'

[0128] BamH I

[0129] P4 5' CGC GTC GAC TTA TCA GCA GCA GAA TGC CCA G 3'

[0130] Sal I

[0131] 下划线部分为酶切位点, 斜体为起始密码子或终止密码子。

[0132] 4.1 HNP 2 基因工程菌 (PHS2) 的制备

[0133] (1) 扩增 mHNP2 片段

[0134] 除缺少编码第一个氨基酸 (甘氨酸) 的密码子 GCC 外, mHNP2 基因序列与 mHNP1 序列完全一致, 通过 PCR 上游引物 (P2) 设计可以去除该密码子。因此, 以重组质粒 pUCm T-mHNP1 为模板, 由 P2、P4 引物经 Termocycler (Biometra 公司) PCR 仪扩增约 0.1kb 的 mHNP2 (图 8)。反应体系为 50ul, 其中 Taq 酶 1.0ul (2u/ul), dNTPs (10mM) 4.0ul, 10 倍反应缓冲液 [200mM Tris-HCl (PH9.0), 500mM KCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100] 5.0ul, P2 和 P4 引物各 2.0ul, 模板 DNA 2.0ul (约 1ng DNA), 用灭菌双蒸水补足体积。反应条件为 :95℃ 预变性 1min, 然后 94℃ 变性 30s, 54℃ 30s, 72℃ 延伸 1min, 共 30 个循环, 最后延伸 10min 补齐末端。PCR 反应后 1.5% 琼脂糖电泳检测, 约为 110bp。

[0135] (2) 回收 mHNP2 片段

[0136] 用回收试剂盒纯化回收 100u1 PCR 产物,溶解于 20u1 灭菌水中。

[0137] (3)mHNP2 片段与载体的连接:

[0138] 将回收的 mHNP2 PCR 产物和 pGEX4T1 分别以 BamH I 和 SaI I 双酶切,酶切后用 PCR 纯化试剂盒再次进行纯化回收。将酶切后回收的目的基因和 pGEX 4T1 按体积比 5 : 1 混合进行连接。反应体系为 10u1,即加入目的 DNA 5u1(0.2pmol),pGEX4T1 1u1,T4 DNA 连接酶 1u1,10 倍连接缓冲液 [660mM Tris-HCl (PH 7.6),66mM MgCl<sub>2</sub>,100mM DTT,1mM ATP]1u1,16°C 过夜连接。得到连接产物 pGEX4T1-mHNP2。

[0139] (4) 重组子的提取及鉴定:

[0140] 将连接产物 (pGEX4T1-mHNP2) 转化大肠杆菌感受态 BL21 (DE3) PlysS。取 8u1 连接产物加入 200u1 感受态菌中,0°C 冰水浴 30min,42°C 水浴 90s,冰水浴 2min,加入 800u1 LB 培养液,37°C 振荡培养 1h 后涂布于含 50mg/ml 氨苄抗性的 LB 板上。用 PCR 鉴定克隆,电泳结果显示,利用 P2、P4 引物扩增出与预期大小 (约 0.1Kb) 的片段 (图 9)。将鉴定的阳性克隆抽提质粒,并进行 BamH I 和 SaI I 双酶切鉴定。最后,进行测序分析。用 DNAMAN 软件分析证实克隆序列与设计序列完全一致。将鉴定正确的转化菌命名为 PHS2。

[0141] 4.2 HNP3 基因工程菌 (PHS3) 的制备

[0142] (1)mHNP3 片段的扩增

[0143] mHNP3 基因与 mHNP1 只是第一个密码子不同,通过 PCR 上游引物 (P3) 设计可以改变该密码子。以重组质粒 pUCmT-mHNP1 为模板,由 P3、P4 引物经 Termocycler (Biometra) PCR 仪扩增约 0.1Kb 的 HNP3 成熟肽编码序列 (图 10)。反应体系为 50u1,其中 Taq 酶 1.0u1 (2u/u1),dNTPs (10mM) 4.0u1,10 倍 PCR 反应缓冲液 5.0u1,P3 和 P4 引物各 2.0u1,模板 DNA (pUCm T-mHNP1) 2.0u1,用灭菌双蒸水补足体积。反应条件为:95°C 预变性 1min,然后 94°C 变性 30s,54°C 30s,72°C 延伸 1min,共 30 个循环,最后延伸 10min 补齐末端。PCR 反应后 1.5% 琼脂糖电泳检测,约为 110bp。

[0144] (2) 回收 mHNP3 片段:

[0145] 用回收试剂盒纯化回收 100u1 PCR 产物,溶解于 20u1 灭菌水中。

[0146] (3)mHNP3 片段与载体的连接:

[0147] 将回收纯化的 mHNP3 PCR 产物和 pGEX4T1 分别以 BamH I 和 SaI I 双酶切,酶切用 PCR 纯化试剂盒进行纯化。将酶切纯化的目的基因和 pGEX 4T1 按体积比 5 : 1 进行连接。反应体系为 10u1,即加入目的 DNA (mHNP3) 5u1,pGEX4T1 1u1,T<sub>4</sub> DNA 连接酶 1u1,连接缓冲液 1u1,16°C,连接过夜。得到连接产物 pGEX4T-mHNP3。

[0148] (4) 重组子的提取及鉴定:

[0149] 将连接产物 (pGEX4T1-mHNP3) 转化大肠杆菌感受态 BL21 (DE3) PlysS。取 8u1 连接产物加入 200u1 感受态菌中,0°C 冰水浴 30min,42°C 水浴 90s,冰水浴 2min,加入 800u1 LB 培养液,37°C 振荡培养 1h 后涂布于含 50mg/ml Amp 抗性的 LB 板上。用 PCR 鉴定克隆,电泳结果显示,利用 P3、P4 引物扩增出与预期大小 (约 0.1Kb) 的片段 (图 11)。将鉴定的阳性克隆抽提质粒,并进行 Bam H I 和 SaI I 双酶切鉴定。最后,进行测序分析。用 DNAMAN 分析证实克隆序列与设计序列完全一致。将鉴定正确的转化菌命名为 PHS3。

[0150] 实施例 2:三种人  $\alpha$  防御素的混合表达及其活性检测

[0151] 1、在混合培养体系中化学诱导表达人  $\alpha$  防御素混合物

[0152] 将鉴定正确的人  $\alpha$  防御素基因工程菌 PHS1、PHS2、PHS3 分别制备甘油菌并且在含氨苄的 LB 固体培养基上划线保存。分别从三种菌板上挑取新鲜的单菌落加入 3ml 含氨苄的 LB 培养基中振荡培养过夜。次日取三种菌的过夜培养物,等量混合。混匀后,按 1% 体积接种到新的 LB 培养基中,在 37°C 剧烈振荡培养 3h 左右至  $OD_{600} \approx 0.6$ 。向培养菌液中加入 1M IPTG,使其终浓度达到 1mmol/L,低温诱导 (30°C) 振荡培养,诱导后 2h、4h、6h 分别取小样检测蛋白表达,最后离心收集细胞。同时设非诱导对照以及空载菌对照。

[0153] 在混合培养体系中对 HNP (包括 HNP1、HNP2、HNP3) 生产工程菌进行 IPTG 诱导表达,表达菌处理后进行 SDS-PAGE 检测。结果见图 12。其中各泳道样本为:1,未诱导转基因菌 2h;2,诱导转基因菌 2h;3,未诱导转基因菌 4h;4,蛋白标准;5,诱导转基因菌 4h;6,未诱导转基因菌 6h;7,诱导转基因菌 6h;8,诱导空载菌 6h;9,未诱导空载菌 6h。从图 12 可见,有 pGEX4T1-mHNP 重组质粒 (pGEX4T1-mHNP1、pGEX4T1-mHNP2、pGEX4T1-mHNP3) 的 BL21 (DE3) PlysS 菌 (三种菌体混合物) 经 IPTG 诱导 2-6 小时后,菌体裂解物增加了一条约 29.5kDa 的蛋白电泳条带 (分别见第 2、5、7 泳道),和预计的蛋白质分子量相符 (GST 蛋白分子量约为 26KD, HNP 成熟肽约 3.5KD),并且在诱导后 2h 就有了比较高的表达量,4h 达到基本达到最大表达量。诱导的空载对照样 (第 8 泳道) 也表达一个比融合蛋白略小的蛋白 (总分子量 28.2KDa,其中 GST 26.0Kda,另加 2.2KDa 的多克隆位点序列编码的段肽)。上清液中以及未诱导对照、空载对照样中均无蛋白分子量大小适合的蛋白条带。

[0154] 诱导表达时间-光密度曲线见图 13。取 PHS1、PHS2、PHS3 三种菌等量混合接种含氨卞青霉素的 100ml LB 培养基,37°C 振摇培养到  $OD_{600} \approx 0.6$ 。然后,将菌一分为二,一半加 1M IPTG (至终浓度 1mmol/L) 诱导,一半不加 IPTG 作处理对照菌。然后在低温条件下 (30°C) 振摇培养,分别于 1h、2h、4h、6h 取 3ml 菌液测其  $OD_{600}$  值并记录数据。实验同时设置空载质粒转化菌 (未诱导) 作样本对照。

[0155] 结果表明,与转基因工程菌未诱导对照细菌生长曲线相比,诱导样诱导开始时的  $OD_{600}$  值与对照一致;经 IPTG 诱导 1h 后,诱导样中的大肠杆菌生长基本没有受到太大影响,说明此时期还没有 HNP 融合蛋白产生;2h 后,急剧下降,以后基本再没有升高,说明在诱导 2-4h 期间,大量产生 HNP 融合蛋白。上述结果提示 HNP 与 GST 基因融合表达,产生的融和蛋白仍具有一定的抑菌活性。

[0156] 2、人  $\alpha$  防御素混合物的活性检测

[0157] (1) 融和蛋白的提取和纯化

[0158] I、目的蛋白的诱导表达以及细胞抽提物制备

[0159] 将 HNP 基因工程菌 PHS1、PHS2、PHS3 菌株分别接种于含 Amp 的 LB 培养基 37°C 活化过夜。次日按 1% 扩大培养至  $OD_{600} \approx 0.6$  时等量混合,然后在混合培养菌液中加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L,继续振荡培养 4h (30°C)。于 4°C 5000g 离心 15min 收获细菌。经 15% SDS-PAGE 电泳检测以及亚细胞定位方法 (J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译。分子克隆实验指南 (第三版)。科学出版社,2002, p1244) 确定目的蛋白主要存在于可溶性胞质中。

[0160] 制备细菌抽提物的方法也参照《分子克隆》(J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译。科学出版社,2002, p1247)。将每 100ml 培养菌液离心收获的菌体沉淀重悬浮在 4ml PBS 溶液中,加入溶菌酶至终浓度 1mg/ml,冰上放置 30min。加入 10ml 0.2% Triton X-100,剧烈振荡混匀。加入 Dnase 和 Rnase 至终浓度 5ug/ml,4°C 振动温育 10min。4°C 3000g 离心 30min,

去除不溶性细胞碎片。上清（细胞裂解物）转移到一新管中，加入 DTT 至终浓度 1mmol/L。上清液用 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤后进行亲和层析。

[0161] II、融和蛋白的亲和层析

[0162] 用 GST 琼脂糖凝胶 FF 柱（北京卓冠群科技有限公司产品）在 AKTA Prime 层析仪（Amershanbiosciences 产品）上进行亲和层析，提取融合蛋白。

[0163] 缓冲液组成如下：

[0164] 缓冲液 1 (20mM pH7.4 的 PBS 溶液) :0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 19ml, 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 81ml 加水至 1000ml。缓冲液 2 (50mM Tris- 盐酸缓冲液, pH8.0) :0.1M Tris 50ml, 0.1 M 盐酸 29.2ml,

[0165] 3070mg 还原型谷胱甘肽, 加水至 1000ml。

[0166] 亲和层析基本步骤如下：

[0167] A、GST 琼脂糖凝胶 FF 装柱, 0.7 $\times$ 2.5cm, 柱床体积为 1ml

[0168] B、用缓冲液 1 平衡 5 个床体积, 流速为 1ml/min

[0169] C、将 10ml 细胞破碎液醇液用缓冲液 1 稀释到 20ml, 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤, 上样。流速为 1ml/min

[0170] D、用缓冲液 1 再洗 10 个床体积, 流速为 1ml/min

[0171] E、用缓冲液 2 洗脱, 流速为 1ml/min, 收集洗脱峰

[0172] III、融合蛋白的裂解以及进一步处理

[0173] 在用 BCA 法测定融合蛋白的含量后, 用凝血酶 (Novagen 产品) 将目的蛋白从 GST 融合蛋白切下 (裂解条件是 20 $^{\circ}$ C 下 16 小时)。最后, 再次进行亲和层析把 GST 和凝血酶去除, 而得到纯的目标蛋白。有关操作按照产品说明书进行。纯化后的融合蛋白经 SDS-PAGE 电泳鉴定, 冻干, 命名为 mHNP 并于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

[0174] (2) 抗菌实验

[0175] A、菌种及材料

[0176] 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)

[0177] 大肠杆菌 (*E. coli* BL21 (DE3))

[0178] mHNP 溶液配制: 纯化 mHNP 蛋白混合物用 0.01% 乙酸分别配置成 50 $\mu$ g/ml、100 $\mu$ g/ml、200 $\mu$ g/ml、500 $\mu$ g/ml 的浓度。

[0179] B、琼脂糖弥散抗菌实验

[0180] 按照 Jeffrey Turner 等 (*Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 1998, 42(9)) 以及刘文超等 (第四军医大学学报. 1997: 18(6) 525-527) 进行。取对数生长期 *E. coli* (BL21 (DE3)) 以及金黄色葡萄球菌各  $3 \times 10^6$  CFU, 各加入 16ml 42 $^{\circ}$ C 灭菌琼脂培养基中 (含营养肉汤粉 4.8mg, 低电渗琼脂糖 160mg, 0.02% TWEEN 20, 以 1mmol/L PH7.4 PBS 配制)。混匀后分别倒入两个直径为 14.5cm 培养皿中, 用打孔器在胶上打孔 (直径为 3mm), 分别加入不同浓度的样品 5 $\mu$ l, 浓度分别为 HNP 为 50 $\mu$ g/ml、100 $\mu$ g/ml、200 $\mu$ g/ml、500 $\mu$ g/ml。阴性对照孔加 0.01% 乙酸。将平皿放入 37 $^{\circ}$ C 温箱中温育 3h, 再铺以 16ml 42 $^{\circ}$ C 灭菌琼脂培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 继续温育 18h。以考马斯亮蓝染色 (考马斯亮蓝 R250 2mg, 甲醇 27ml, 甲醛 15ml, 水 63ml) 24h, 活菌着蓝色, 死菌不着色。观察以加样孔为中心的杀菌环大小。

[0181] C、结果

[0182] 用琼脂糖弥散抗菌实验检测 mHNP 的杀菌活性。杀菌环大小表示其杀菌活性的强

弱。结果见图 14。纯化后的 mHNP 在 50ug/ml 的浓度就表现出较高的杀菌活性,随着浓度增加而活性增强。不同菌株对防御素的敏感性有差异,对大肠杆菌的作用比对金黄色葡萄球菌的作用略强。

[0183] SEQUENCE LISTING

[0184] <110> 甘肃亚盛盐化工业集团有限责任公司

[0185] <120> 基因工程菌混合培养生产三种人  $\alpha$  防御素的方法

[0186] <160>3

[0187] <170>PatentIn version 3.1

[0188] <210>1

[0189] <211>90

[0190] <212>DNA

[0191] <213>Homo sapiens

[0192] <400>1

[0193] gcctgctatt gccgtattcc agcctgcatt gcaggcgaac gtcgttatgg cacctgcatc  
60

[0194] t a c c a g g g c c g t c t c t g g g c a t t c t g c t g c  
90

[0195] <210>2

[0196] <211>87

[0197] <212>DNA

[0198] <213>Homo sapiens

[0199] <400>2

[0200] tgctattgcc gtattccagc ctgcattgca ggcgaacgtc gttatggcac ctgcatctac  
60

[0201] c a g g g c c g t c t c t g g g c a t t c t g c t g c  
87

[0202] <210>3

[0203] <211>90

[0204] <212>DNA

[0205] <213>Homo sapiens

[0206] <400>3

[0207] gactgctatt gccgtattcc agcctgcatt gcaggcgaac gtcgttatgg cacctgcatc  
60

[0208] t a c c a g g g c c g t c t c t g g g c a t t c t g c t g c  
90



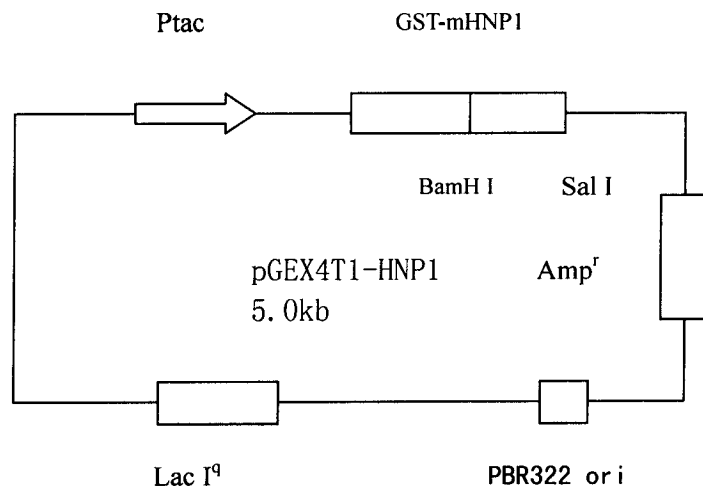


图 1

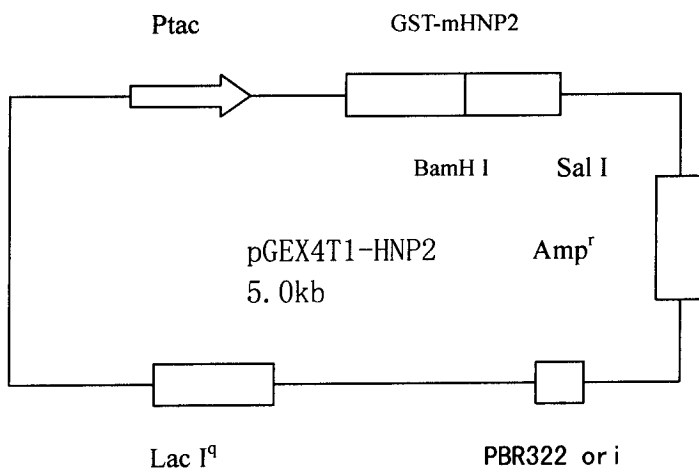


图 2

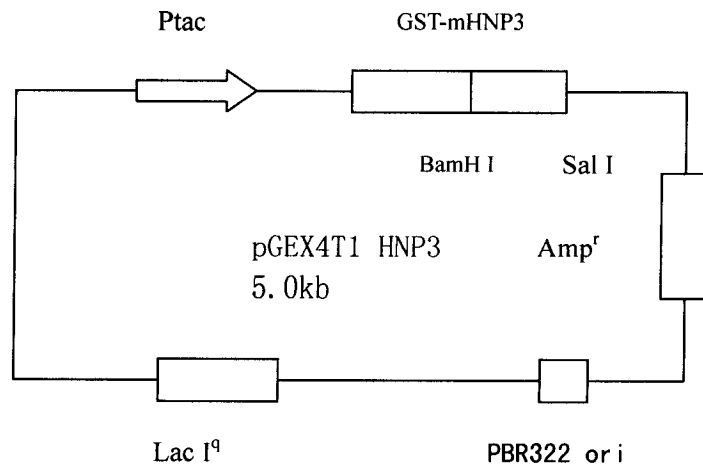


图 3

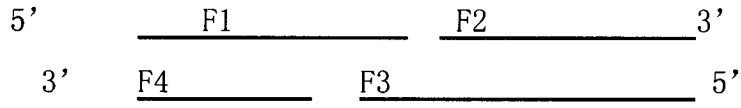


图 4

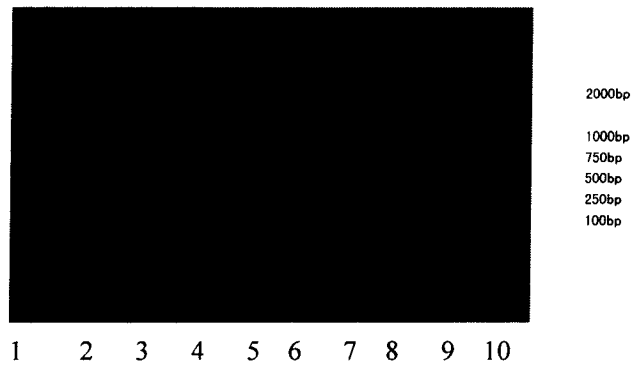


图 5

pGEX-4T-1 (27-4580-01)  
 Thrombin  
 Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His Arg Asp  
 CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG GAA TTC CCG GGT CGA CTC GAG CGG CCG CAT CGT GAC TGA  
 BamHI EcoRI SmaI SalI XhoI NotI Stop codons

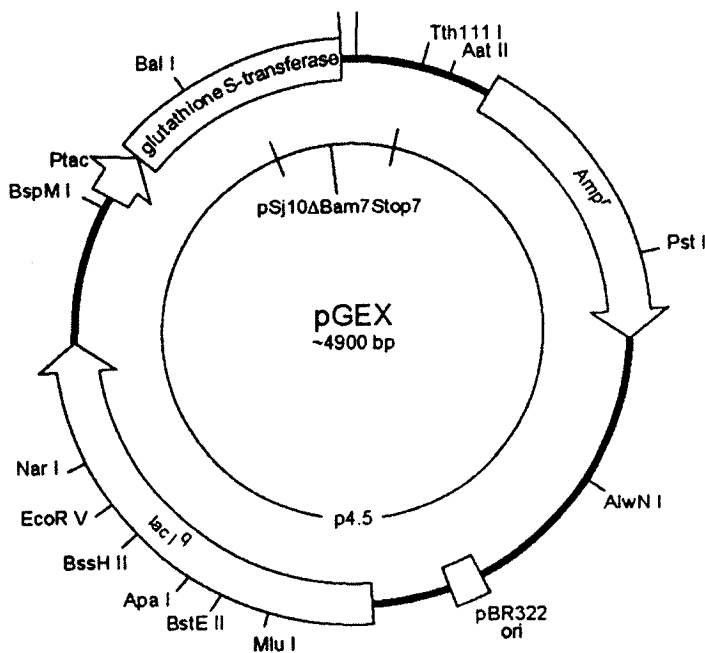


图 6

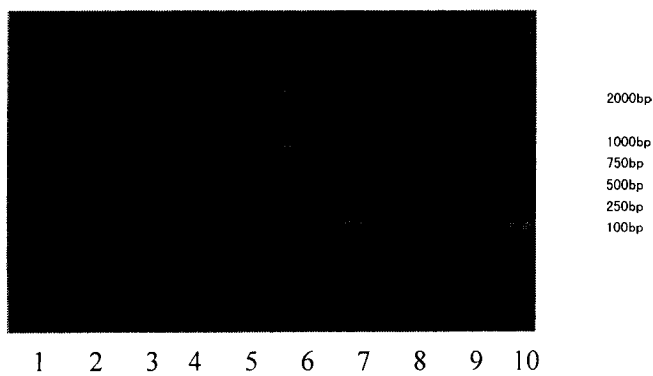


图 7

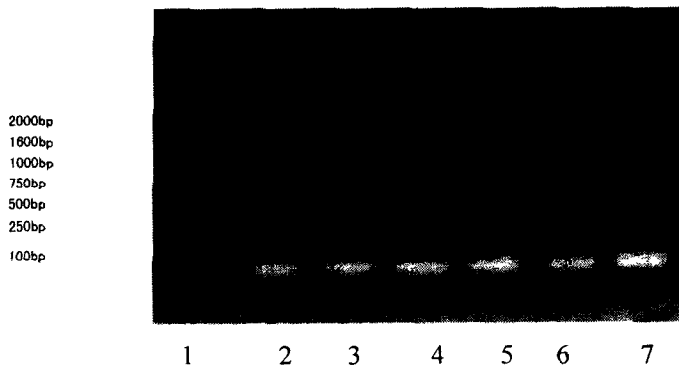


图 8

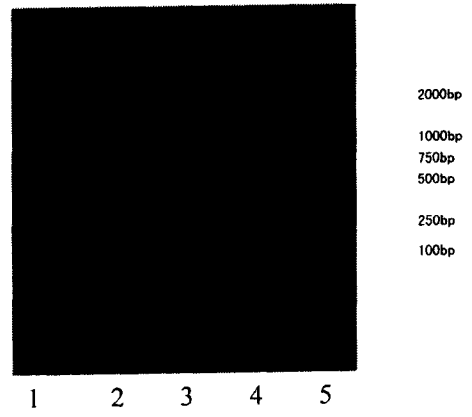


图 9

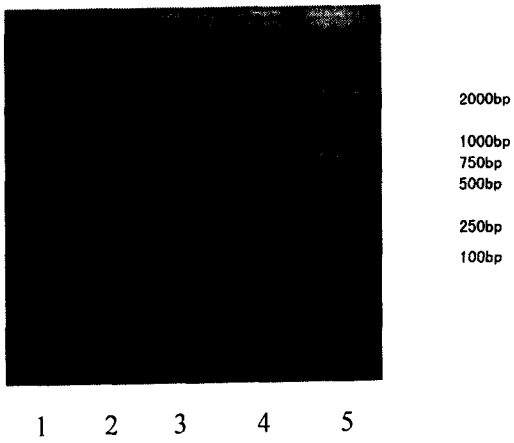


图 10

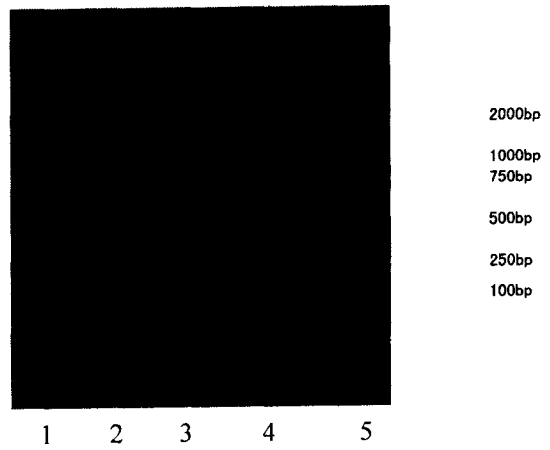


图 11

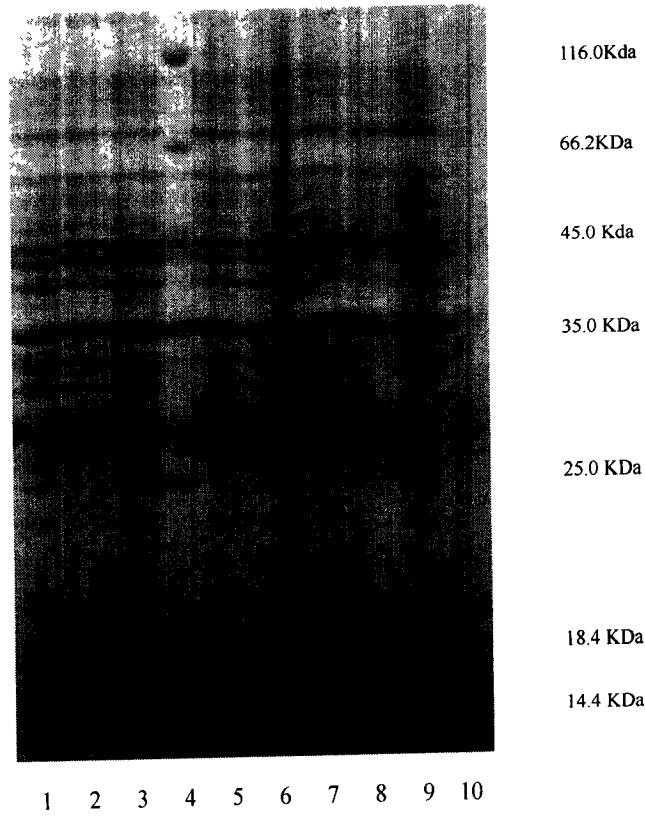


图 12

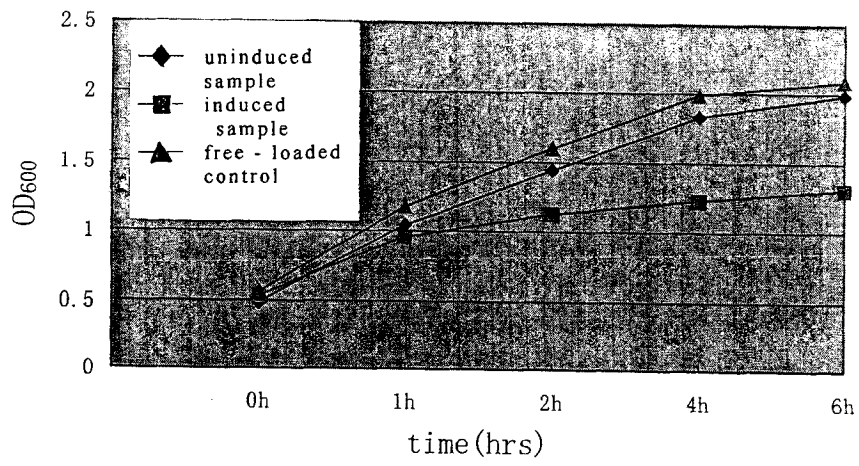


图 13

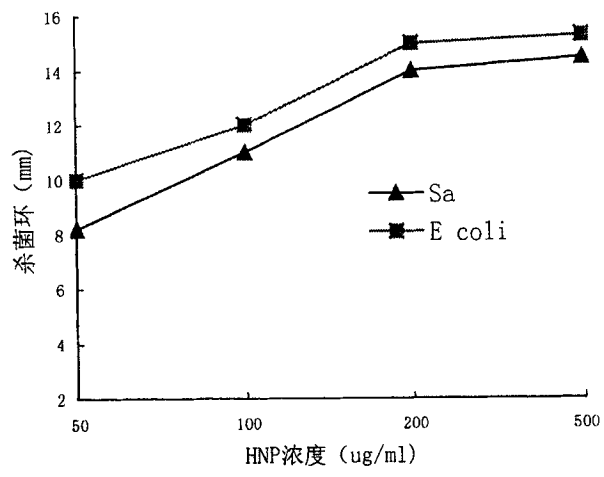


图 14