

黄喉拟水龟巨噬细胞炎症蛋白-3 α 重组表达及抗菌活性分析

龙建杰^{1,2}, 朱新平^{1,2*}, 史 燕¹, 赵 建¹, 洪孝友¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所,
农业部热带亚热带水产种质资源利用与养殖重点实验室,广东 广州 510380;
2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

摘要: 巨噬细胞炎症蛋白-3 α 是一种可诱导的分泌蛋白,通过相应受体对多种免疫细胞产生趋化,在多种疾病的免疫反应和炎症损伤中发挥重要作用。实验采用 RT-PCR 技术克隆出黄喉拟水龟巨噬细胞炎症蛋白-3 α (MaCCL20) 的成熟肽基因序列,通过双酶切将目的基因序列插入到表达载体 pET-32a 上,然后转化进大肠杆菌 BL21 中,经 IPTG 诱导后表达出了 pET-32a-CCL20 融合蛋白,以该融合蛋白为抗原制备多克隆抗体并进行 Western-blotting 鉴定及抑菌性检测。实验表明,融合蛋白在 37 $^{\circ}$ C、0.8 mmol/L IPTG,4 h 条件下得到高效表达;经 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western-blotting 分析显示,所表达融合蛋白相对分子量为 30 ku,与预测蛋白大小一致并与带 His 标签的多克隆抗体发生特异性反应。经 His Bind 镍柱纯化后 SDS-PAGE 电泳检测出现单一条带,说明获得了纯度较高的 MaCCL20 重组蛋白。抑菌实验表明, MaCCL20 重组蛋白对金黄色葡萄球菌、粘质沙雷氏菌和嗜水气单胞菌都有较强的抑菌作用。

关键词: 黄喉拟水龟; 巨噬细胞炎症蛋白-3 α ; 重组表达; 抗菌活性

中图分类号: S 943

文献标志码: A

黄喉拟水龟 (*Mauremys mutica*) 是我国南方常见的土著龟种,具有较高的观赏、药用及食用价值,随着其人工繁殖及饲养的成功^[1-2],已逐渐显示出良好的经济前景,目前为华南地区主要养殖龟种之一。巨噬细胞炎症蛋白-3 α (Macrophage inflammatory protein, MIP) 又名 CCL20,是一种强力趋化蛋白^[3],其已知的唯一受体为 CCR6,由未成熟 DCs、B 细胞、记忆 T 细胞、调控 T 细胞等上皮类细胞表达^[4-5],其对免疫细胞有很强的趋化作用^[6-8]。研究显示 CCL20 具有一定的限制性表达部位,仅在粘膜和炎症上皮组织中表达^[9],在胸腺器官中表达明显^[10];CCL20 的受体 CCR6 是调节性 T 细胞的标志之一^[11],在固有免疫以及获得性免疫中发挥着重要作用^[12]。本实验室用粘质沙雷氏菌感染黄喉拟水龟,通过 SMART 技术构建了黄喉拟水龟的全长 cDNA 文库^[13],其中 MaCCL20 为文库中免疫相关基因之一。本研究

对 MaCCL20 进行原核表达,对表达蛋白进行了纯化与复性,同时制备了所得蛋白的多克隆抗体并进行 Western-blotting 鉴定与抑菌性分析,为后续蛋白功能研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及菌种

大肠杆菌 BL21、DH5 α 、pMD18-T vector system、Ex Taq 酶、SacI、KpnI、DNA Fragment Purification Kit Ver2.0 购自宝生生物工程(大连)有限公司;IPTG、Tris、SDS、TEMED、EDTA 购自 Promega 公司;宽分子量 Marker、质粒小提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;HRP-DAB 底物显色试剂盒、HRP-GoatAnti-Rabbit IgG 购自武汉博士德生物工程有限公司;His Bind Purification Kit 购自 Novagen 公司;丙烯酰胺、硝酸纤维素膜、SDS、甲叉双丙烯酰胺购自鼎国生物技术有限责任公司。

收稿日期:2012-08-22 修回日期:2012-12-26

资助项目:国家农业科技成果转化资金项目(2011GB23260021);中国水产科学研究院院级基本科研业务费专项(2012A0403);广州市珠江科技新星专项(2012089)

通信作者:朱新平, E-mail: zhuxinping_1964@yahoo.com.cn

粘质沙雷氏菌与金黄色葡萄球菌由珠江水产研究所谭爱萍等提供,嗜水气单胞菌由本实验室史燕老师保存。

1.2 引物设计与合成

根据 ExPASy (<http://www.expasy.org/>) 网站的多个功能,找出 *MaCCL20* 基因的 ORF 框。通过软件 Primer primer 5 对 pET32a 载体质粒和 *MaCCL20* 基因 ORF 框序列进行分析,选择 *Kpn* I 和 *Sac* I 作为表达载体的酶切位点,设计出了一对特异性引物:

CCL20-Kpn I : 5'-AGTGGTACCATGGGGC-TGCTGCTATT-3'

CCL20-Sac I : 5'-GCGGAGCTCTTACAGTG-ACATCTTCTTGAG-3'

将设计好的引物送往上海英骏生物技术有限公司合成。

1.3 *MaCCL20* 基因 ORF 克隆

以本实验室保存文库 cDNA 为模板,用上述引物进行 PCR 扩增,反应体系如下: ddH₂O 31 μ L, 10 \times Ex *Taq* 酶 Buffer 5 μ L, dNTP (10 mmol/L each) 1 μ L, *CCL20-Kpn* I 1 μ L, *CCL20-Sac* I 1 μ L, 库 cDNA 10 μ L, Ex *Taq* 酶 1 μ L, 总体积 50 μ L。PCR 反应条件: 先 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 经 35 个循环后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

上述 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后纯化回收, 纯化产物连接到 pMD-18T 载体上并转化进 DH5 α 中, 经过菌液 PCR 鉴定后将筛选得到的阳性克隆菌株送往英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。

1.4 重组表达载体 pET-32a-*CCL20* 的构建

提取测序正确 *MaCCL20* 菌株的质粒 DNA, 用 *Sac* I 和 *Kpn* I 酶分别对目的片段 *MaCCL20* 和表达载体 pET-32a 的质粒 DNA 进行双酶切, 酶切产物经纯化回收后用 T₄DNA 连接酶将 *MaCCL20* 插入到 pET-32a 中。构建好的载体经酶切与 PCR 鉴定后送往英潍捷基(上海)贸易有限公司测序, 提取测序正确重组表达质粒并转化进 BL21 感受态细胞中。

1.5 *MaCCL20* 重组蛋白的诱导及纯化

将重组菌液接种到含 Amp 液体的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 震荡过夜。次日, 取培养过夜的菌液按照 1:50 的比例扩大培养至 OD₆₀₀ 值

达到 0.6 左右, 向菌液中分别加入终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床上分别诱导 1、2、3 和 4 h。收集上述不同条件诱导的重悬菌体, 通过 SDS-PAGE 电泳结果确定 *MaCCL20* 融合蛋白诱导表达的最适条件。

根据上述所确定的条件对工程菌进行大量诱导, 用 PBS 清洗菌体, 冰浴超声破碎 30 min 后用含 2 和 4 mol/L 尿素的 PBS 清洗菌体, 收集到的沉淀溶于含 6 mol/L 尿素的 PBS 中, 37 $^{\circ}$ C、120 r/min 恒温摇 1 h, 10 000 r/min 离心 25 min, 保存上清。

用 Novagen His Bind 蛋白纯化试剂盒对所得蛋白进行纯化, 将所得蛋白在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中用含梯度摩尔浓度尿素的透析液进行透析。收集复性蛋白, 用 PEG 进行浓缩, 最后分别用 SDS-PAGE 电泳和分光光度计检测蛋白的纯度及其浓度。

1.6 *MaCCL20* 重组蛋白多克隆抗体的制备及 Western-blotting 鉴定

取 3 mL 浓缩后的重组蛋白送往珠海英平生物有限公司进行多克隆抗血清的制备。

IPTG 诱导后的菌液样品经 SDS-PAGE 电泳后, 采用湿转法将凝胶上的蛋白转至硝酸纤维素膜上, 利用融合蛋白上的 His 标签, 以制备的兔抗血清为一抗、HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, DAB 显色, 进行 Western-blotting 分析。

1.7 *MaCCL20* 重组蛋白抗菌活性检测

采用琼脂糖扩散抑菌圈法, 培养金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* Rosenbach)、粘质沙雷氏菌及嗜水气单胞菌至对数期, 取 10 μ L 菌液与 1 mL 液态 LB 固体培养基混匀, 均匀的涂于 LB 固体培养基平板上。待混合液凝固后, 放置牛津杯并加入 200 μ L 复性好的 600 ng/mL 重组蛋白 *MaCCL20*, 以最后一次透析液作为对照, 过夜培养 16 h, 观察并测量出抑菌圈的直径。

取灭菌试管 15 支, 平均分成 3 组, 取对数生长期的金黄色葡萄球菌、粘质沙雷氏菌和嗜水气单胞菌, 将其稀释至 10⁵/mL, 每支试管加 0.5 mL。向第 1 支试管中加入 0.5 mL 重组蛋白 *MaCCL20*, 混匀后加入到第 2 支试管中, 同样的方法依次稀释至第 5 支试管, 1~5 管中重组蛋白的浓度分别为 300、150、75、37.5 及 18.75 ng/mL, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 18 h, 根据细菌的生长状况来确定其最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。

2 结果

2.1 MaCCL20 原核表达载体的构建

以文库 cDNA 为模板经特异性 PCR 扩增得到预期大小约为 261 bp 的特异性条带(图 1)。切胶纯化后连接到 pMD18-T 载体后测序,结果与 PRF 序列比对,显示 ORF 框克隆正确。将阳性克隆 ORF 与 pET-32a 载体分别用 *Kpn*I 和 *Sac*I 进行双酶切,酶切产物连接得到重组载体质粒,经测序比对显示重组表达质粒构建成功,说明 *MaCCL20* 基因成功插入到了 pET-32a 表达载体上。

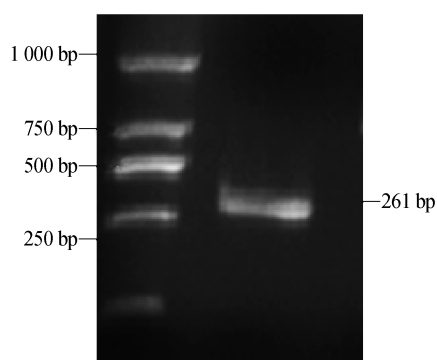


图 1 ORF 框的克隆

Fig.1 Cloning of the ORF

2.2 重组蛋白诱导表达

将表达菌株分别用不同浓度的 IPTG 诱导不同时间,以空质粒载体 pET-32a 和未经 IPTG 诱导的表达菌作为对照,SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示,经 IPTG 诱导的重组菌在 29 ku 出现一条很强的蛋白带,与理论蛋白分子量一致,而空质粒载体 pET-32a 及未诱导的表达菌在此位置均没有目的条带出现,说明 *MaCCL20* 重组蛋白表达成功。将表达菌株分别诱导 1、2、3、4 h,重组菌表达量随着时间而增多(图 2)。分别用终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达菌 4 h,结果显示,1 mmol/L 浓度 IPTG 诱导产生的蛋白较少,其他 4 个浓度 IPTG 诱导产生的蛋白相差不大。综合上述结果,我们选取浓度为 0.8 mmol/L IPTG 诱导 4 h 的重组菌进行后续重组蛋白的大量表达。

2.3 MaCCL20 重组蛋白的纯化及 Western-blotting 鉴定

重组菌经过诱导表达、超声破碎后,离心收集包涵体。用含 2 mol/L 尿素的 PBS 洗涤 2 次,去除杂蛋白,然后直接溶于含 6 mol/L 尿素的 PBS

中,37 °C 慢摇 1 h。离心后取上清。收集上述实验过程部分包涵体与上清,SDS-PAGE 凝胶电泳检测(图 3),结果表明 *MaCCL20* 蛋白可溶性极小,主要以包涵体形式存在于细胞中。将上述初步纯化的上清蛋白液过 HisBind 镍离子亲和层析柱,再梯度透析复性,SDS-PAGE 凝胶电泳检测(图 4),结果显示经纯化获得了较纯的融合蛋白。

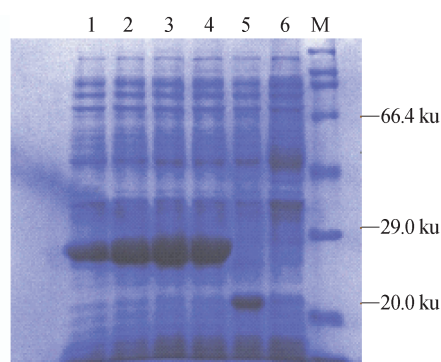


图 2 pET-32a-CCL20 在大肠杆菌中表达 SDS-PAGE

M. 宽分子量标准蛋白; 1~4. 0.8 mmol/L IPTG 诱导时间 1~4 h 重组蛋白; 5. pET-32a 空载体诱导 4 h; 6. 未加 IPTG 诱导的重组菌。

Fig.2 SDS-PAGE of MaCCL20 expressed in *E. coli*. BL21 (DE3)

M. broad molecular standard proteins; 1 - 4. recombinant proteins induced by 0.8 mmol/L IPTG for 1 - 4 h; 5. pET-32a empty vector induced for 4 h; 6. expression of negative control.

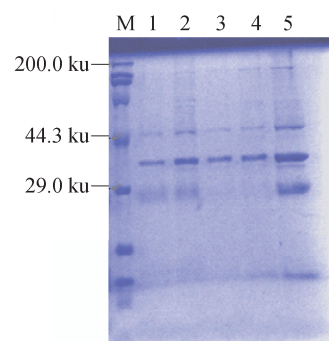


图 3 重组蛋白 pET-32a-CCL20 初步纯化 SDS-PAGE 电泳图

M. 宽分子标准蛋白 marker; 1. 6 mol/L 尿素混合液上清; 2. 6 mol/L 尿素包涵体; 3. 破碎上清; 4. 2 mol/L 尿素洗涤上清; 5. 破碎沉淀。

Fig.3 The recombinant protein pET-32a-CCL20 preliminary purification by SDS-PAGE

M. broad molecular standard protein marker; 1. 6 mol/L urea mixture supernatant; 2. 6 mol/L urea inclusion body; 3. broken supernatant; 4. 2 mol/L urea wash supernatant; 5. broken precipitation.

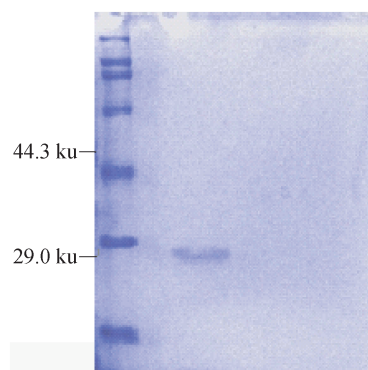


图4 经 HisBind 纯化后重组蛋白 SDS-PAGE 分析
Fig.4 Purified MaCCL20/His fusion protein

由于 pET-32a-CCL20 融合蛋白带有 His 标签,以此蛋白制备兔的多克隆抗体,以此抗体为一抗,HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗,进行 Western-blotting 检测,结果见图 5,在 30 ku 左右出现特异性条带,表明蛋白表达成功。

2.4 MaCCL20 重组蛋白抗菌活性

抑菌实验表明, MaCCL20 重组蛋白对金黄色葡萄球菌、粘质沙雷氏菌及嗜水气单胞菌均有抑

菌作用(图 6)。金黄色葡萄球菌、粘质沙雷氏菌及嗜水气单胞菌的抑菌圈直径分别为 1.7 cm、2.0 cm 和 2.1 cm。最小抑菌浓度实验结果显示 MaCCL20 重组蛋白对嗜水气单胞菌的 MIC 值为 150 ng/mL,对金黄色葡萄球菌和粘质沙雷氏菌的 MIC 值大于 300 ng/mL。这说明在 3 种菌中, MaCCL20 重组蛋白对嗜水气单胞菌的抑菌效果最强。

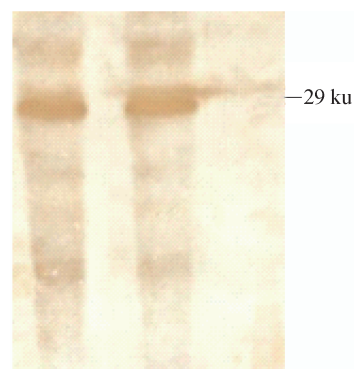


图5 Western-blotting 检测纯化的 MaCCL20 重组蛋白
Fig.5 Western-blotting analysis of the recombination MaCCL20

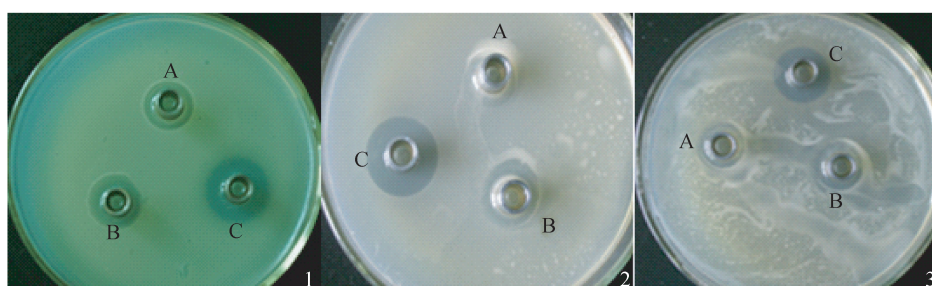


图6 MaCCL20 重组蛋白抑菌活性检测

1. 粘质沙雷氏菌; 2. 嗜水气单胞菌; 3. 金黄色葡萄球菌; A. 空白对照组; B. 300 ng/mL 重组蛋白; C. 600ng/mL 重组蛋白。

Fig.6 The antimicrobial activities of recombinant MaCCL20 on *S. aureas*, *Aeromonas hydrophila* and *Serratia marcescens*

1. *Serratia marcescens*; 2. *Aeromonas hydrophila*; 3. *S. aureas*; A. negative control; B. protein concentration of 300 ng/mL; C. protein concentration of 600 ng/mL.

3 讨论

大肠杆菌原核表达系统培养周期短,表达量比较高,成本也相对较低,是一个很好的工具。pET 是如今原核表达使用最广泛的系统。在该系统中,将目的基因与 pET 载体连接一起时,会受到强噬菌体 T7 转录及翻译的控制。在 T7RNA 聚合酶作用下,诱导表达仅需几个小时就能让目的蛋白数量达到总蛋白的一半以上。该系统另一个特点是可以使目的基因在非诱导条件下不转

录。本实验所选的表达载体为 pET-32a,它含有 T7lac 启动子,属于 Trx 融合蛋白表达载体,载体上具有 His. Tag/S. Tag 融合标签,可以用镍柱亲和层析法对融合蛋白进行纯化。在 pET-32a 载体上有一段编码序列,在融合蛋白表达时,它与 6 个组氨酸标签序列会和目的基因一起表达,其表达蛋白大小约为 20 ku,因此目的基因与表达载体 pET32-a 形成重组蛋白经 SDS-PAGE 和 Western-blotting 鉴定时,特异性条带会比预想的大 20 ku 左右。本实验预测目的基因 MaCCL20 编码氨基

酸组成的多肽分子量为 9.739 ku,而重组蛋白 SDS-PAGE 凝胶检测特异性条带大小在 30 ku 附近,与上述相符。本实验诱导表达的融合蛋白主要以包涵体形式存在,MacCCL20 蛋白分子量比较小,而根据 ProtScale 对氨基酸序列疏水性进行分析,推测 MacCCL20 蛋白为疏水性蛋白,其形成包涵体可能与其表面亲水性有关。

CCL20 是一种天然的抗菌蛋白,其对球菌和 G⁻ 杆菌有较强的抗菌活性,对真菌无明显作用^[14]。本实验对金黄色葡萄球菌、粘质沙雷氏菌以及嗜水气单胞菌 3 种细菌进行了抗菌性检测,金黄色葡萄球菌为 G⁺ 球菌,粘质沙雷氏菌和嗜水气单胞菌均为 G⁻ 杆菌,实验表明 MacCCL20 对三种细菌均有较强的抑菌作用。CCL20 是肝脏中的看家趋化蛋白,它与机体特异性细胞免疫(CTL)可能有着密切关系^[15]。CCL20 是高度保守的编码基因,其蛋白质一般会以自分泌或旁分泌的形式出现^[16]。其通过与受体 CCR6 的共同作用,参与机体各类免疫相关反应调节。近年来,人们对趋化因子的作用机理逐渐认识;增强或者减弱胞内信号转导途径及 CCL20/CCR6 的相互作用,有可能为各种免疫疾病的防治提供新的方法。

迄今为止,对 CCL20 的研究主要局限于人体免疫和疾病方面,其蛋白功能还有待深入探讨。本实验成功构建了黄喉拟水龟 pET32-a-CCL20 重组载体,经镍离子亲和层析柱纯化后得到较纯的融合蛋白,并以此蛋白制备了多克隆抗体,通过 Western-blotting 验证了蛋白的表达,同时研究了其抑菌活性,可为后续 MacCCL20 蛋白功能研究打下了基础。

参考文献:

- [1] 朱新平,陈永乐,魏成清,等. 黄喉拟水龟的繁殖生物学研究[J]. 水生生物学报,2001,25(5):454-460.
- [2] 朱新平,陈永乐,魏成清,等. 人工饲养对黄喉拟水龟繁殖力的影响[J]. 中国水产科学,2001,8(2):52-54.
- [3] Charbonnier A S, Kohrgruber N, Kriehuber E, et al. Macrophage inflammatory protein 3 α is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells[J]. The Journal of Experimental Medicine, 1999,190(12):1755-1768.
- [4] Shen Y, Iqbal J, Xiao L, et al. Distinct gene expression profiles in different B-cell compartments in human peripheral lymphoid organs[J]. BMC Immunology,2004,5:20-28.
- [5] Middel P, Raddatz D, Gunawan B, et al. Increased number of mature dendritic cells in Crohns disease: evidence for a chemokine mediated retention mechanism[J]. Gut-BM J Journals, 2006,55(2):220-227.
- [6] Furumoto K, Soares L, Engleman E G, et al. Induction of potent antitumor immunity by situ targeting of intratumoral DCs[J]. The Journal of Clinical Investigation,2004,113(5):774-783.
- [7] Baunfforth K R, Birgersdotter A, Reynolds G M, et al. Expression of the Ep-Stein-Barr virus-encoded Epstein Barr virus nuclear antigen in Hodgkin's lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells[J]. American Journal of Pathology,2008,173(1):195-204.
- [8] Woltman A M, Defijter J W, van Der Kooij S W, et al. MIP-3 α /CCL20 in renal transplantation and its possible involvement as dendritic cell chemoattractant in allograft rejection[J]. American Journal of Transplantation,2005,5(9):2114-2125.
- [9] Weckmann M, Collison A, Simpson J L, et al. Critical link between TRAIL and CCL20 for the activation of TH2 cells and the expression of allergic airway disease[J]. Nature Medicine,2007,13(11):1308-1315.
- [10] Hieshima K, Lmai T, Opendakker G, et al. Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine(LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2[J]. The Journal of Biological Chemistry,1997,272(9):5846-5853.
- [11] Kleinewietfeld M, Puentes F, Borsellino G, et al. CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25⁺ CD4⁺ T-cell subset[J]. Blood,2005,105(7):2877-2886.
- [12] Williams I R. CCR6 and CCL20: partners in intestinal immunity and lymphorganogenesis[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006;1072:52-61.
- [13] 赵密,朱新平,史燕,等. 粘质沙雷氏菌诱导的黄喉拟水龟 SMART cDNA 文库构建及相关基因的鉴定[J]. 华中农业大学学报,2011,30(1):99-104.
- [14] 岳海岭,彭代智. CCL20 的结构域功能[J]. 免疫学杂志,2004,20(3):100-102.
- [15] Furumoto K, Soares L, Engleman E G, et al.

- Induction of potent antitumor immunity by *in situ* targeting of intratumoral DCs [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2004, 113(5): 774 – 783.
- [16] He S, Cao Q, Yoneyama H, *et al.* MIP-3 α and MIP-1 α rapidly mobilize dendritic cell precursors into the peripheral blood [J]. Journal of Leukocyte Biology, 2008, 84(6): 1549 – 1556.

Recombinant expression and antimicrobial activity analysis of macrophage inflammatory protein-3 α in *Mauremys mutica*

LONG Jianjie^{1,2}, ZHU Xinping^{1,2*}, SHI Yan¹, ZHAO Jian¹, HONG Xiaoyou¹

(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation of Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Macrophage inflammatory protein-3 α is a kind of inducible secreted protein which plays an important role in the immune response and inflammation damage in many diseases through the corresponding receptors on a variety of immune cells to produce chemokines. We obtained the ORF of MaCCL20 by RT-PCR, inserted into the expression vector pET-32a, and then transformed into *E. coli* BL21. We expressed the fusion protein pET-32a-CCL20 after IPTG induction, prepared the polyclonal antibodies and did research on Western blot and antimicrobial activity of it. The experiments show that the fusion protein is highly expressed in the conditions of 37 °C, 0.8 mmol/L IPTG for 4 hours. The SDS-PAGE gel electrophoresis figure shows that the relative molecular weight of the fusion protein is 30 ku which is the same as predicted before. We got a single band after His Bind nickel column purification indicating the high purity of MaCCL20 recombinant protein. The antibacterial experiments show that MaCCL20 recombinant protein has strong antibacterial effects on *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, and *Aeromonas hydrophila*.

Key words: *Mauremys mutica*; macrophage inflammatory protein-3 α ; recombinant expression; antibacterial activity

Corresponding author: ZHU Xinping. E-mail: zhuxinping_1964@yahoo.com.cn