

文章编号: 1000-0615(2017)01-0001-10

DOI: 10.11964/jfc.20160410336

斑点叉尾鲟*BPI1*基因的原核表达及生物信息学分析

王兴丽¹, 汪开毓^{1,2*}, 陈德芳³, 朱劼垚³,
杨倩¹, 贺扬¹, 王二龙¹

(1. 四川农业大学鱼病研究中心, 四川成都 611130;

2. 四川农业大学动物疾病与人类健康四川省重点实验室, 四川成都 611130;

3. 四川农业大学动物科技学院, 四川成都 611130)

摘要: 为探究斑点叉尾鲟*BPI1*抗菌肽基因编码蛋白的结构特征, 实验提取斑点叉尾鲟肾脏RNA, 根据*BPI1*基因序列设计引物, 利用PCR方法克隆*BPI1*基因并构建至原核表达载体pTWIN1中。构建成功的重组质粒pTWIN1-*BPI1*经原核表达, SDS-PAGE检测显示得到约为50 ku的融合蛋白, 与预期结果相一致。通过生物信息学软件对*BPI1*基因编码的蛋白序列进行分析, 结果显示, 克隆所得斑点叉尾鲟*BPI1*基因编码一条由223个氨基酸残基组成的多肽, 等电点为9.07, 属于BPI超家族, 是稳定的亲水蛋白。亚细胞定位*BPI1*分布在线粒体(43.5%)、细胞质(30.4%)和细胞核(26.1%)中, 表明*BPI1*可能在嘌呤和嘧啶合成以及能量代谢等过程中发挥信号转导、促进生长等重要作用。二级结构以 α -螺旋和 β -折叠为主, 三级结构呈棒状。同源性及进化树分析表明, 实验所得*BPI1*基因序列与斑点叉尾鲟*BPI1*抗菌肽基因的同源性最高, 序列一致性为99.1%, 进化树聚为一支, 表明*BPI1*基因编码的蛋白序列在相同物种中的突变率较低, 保守性较高, 相同物种中其生物活性与个体间的差异关系较小。

关键词: 斑点叉尾鲟; *BPI1*基因; 原核表达; 生物信息学分析

中图分类号: Q 785; S 941.42

文献标志码: A

斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)亦称沟鲶, 是我国重要养殖品种和主要出口型鱼类^[1], 具有极高的经济价值。近年来烂鳃病、肠道败血症、斑点叉尾鲟病毒病、水霉病以及小瓜虫病等引起的斑点叉尾鲟大量死亡给养殖户造成了巨大的经济损失。对斑点叉尾鲟疾病的防治常以抗生素为主, 各种抗生素的使用会使斑点叉尾鲟的养殖环境逐渐恶化, 甚至危害了人类健康。抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)是由生物机体免疫防御系统产生的一类对抗外源性病原微生物的小分子多肽物质, 是机体自身免疫系统的重要组成部分^[2]。国内外研究表明, 抗菌肽具有广谱抗细菌、真菌、病毒和寄生虫等作用, 且与

抗生素作用机制有区别, 不易产生耐药性, 因此有望成为抗生素的最佳替代品^[3-5]。

杀菌/渗透-增强蛋白(bactericidal permeability-increasing protein, BPI)是抗菌肽中的一种, 最早由Weiss等^[6]从人的多形核白细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMN)中分离获得, 随后在各种鱼体内均有发现^[7-10]。X射线晶体学结构表明, BPI具有包含BPI1的氨基端结构域和BPI2的羧基端结构域, 且BPI1氨基端结构域具有重要的生物学功能^[11-12]。本实验利用基因工程技术对斑点叉尾鲟*BPI1*抗菌肽功能结构域进行了克隆, 并通过生物信息学相关软件对其结构和功能等进行预测、分析, 最后通过自剪切表达载体pTWIN1

收稿日期: 2016-04-02 修回日期: 2016-11-27

资助项目: 四川省科技厅应用基础项目(2014JY0143); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(IRT0848)

通信作者: 汪开毓, E-mail: kywang1955@126.com

对其进行重组表达并对表达产物进行SDS-PAGE检测, 以期对斑点叉尾鲷BPII抗菌肽的生理生化性质、结构功能和基因工程制备等提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用斑点叉尾鲷体质量为150~200 g, 购自四川省成都某水产市场。

1.2 主要试剂

RNA提取试剂盒、DNA胶回收试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司; TaKaRa反转录试剂盒、pMD19-T (Simple)克隆载体、T4 DNA连接酶、DNA Marker、DNA凝胶回收试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司。PCR PreMix、细菌基因组DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。质粒小量抽提试剂盒购于上海生工工程有限公司, 限制性内切酶*Nru I*和*BamH I*购自Thermo Scientific公司。pTWIN1表达载体购自NEB公司。

1.3 实验方法

斑点叉尾鲷总RNA的提取 利用RNA提取试剂盒说明书对斑点叉尾鲷肾脏组织总RNA进行提取, 紫外分光光度计与1%琼脂糖凝胶电泳检测提取质量。按照反转录试剂盒说明书操作步骤反转录为cDNA, -70 °C保存备用。

引物设计 参考NCBI中斑点叉尾鲷抗菌肽BPII的mRNA序列(GenBank登录号: AY816351), 采用SignalP 4.1和TMHMM跨膜区分析软件查找信号肽和跨膜区序列并去除、截取主要功能区域, 并以此为模板序列, 运用Primer 5.0和Oligo 6.0软件设计上下游引物以扩增BPII基因, 并添加酶切位点。设计的引物序列分别为上游引物(F)5'-GTCGCGAATGACATCATTGTACA CAACGTTATACTTAGAGTCACACAG-3', 下游引物(R)5'-GGATCCCTAGTAGAACTCCCC T-3', 下划单线是为保证自剪切表达载体内含肽的完整性而补加的序列, 下划双线分别为添加的酶切位点*Nru I*和*BamH I*。预期扩增片段大小为690 bp, 引物由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。

斑点叉尾鲷抗菌肽的cDNA克隆及目的片段PCR扩增 以分离的mRNA为模板, 参照TaKaRa反

转录试剂盒说明书合成cDNA链, 以此cDNA为模板, 利用合成的特异性引物PCR扩增斑点叉尾鲷BPII基因。总反应体系25 μL: cDNA模板2 μL, 上下游引物各1 μL, PreMix 12.5 μL, dd H₂O 8.5 μL。反应条件: 95 °C预变性5 min, 95 °C变性30 s, 58 °C退火1 min, 72 °C延伸1 min, 30个循环; 72 °C终延伸10 min, 4 °C保存。PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

目的片段T克隆及鉴定 使用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收1%琼脂糖电泳的目的片段, 与pMD19-T克隆载体在16 °C条件下连接过夜; 次日将连接产物转化到DH5α大肠杆菌(*E.coli*)感受态细胞中, 在含Amp (100 μg/mL)的LB平板上, 37 °C培养12~16 h后挑取单个菌落进行LB试管培养12 h, 采用质粒小量抽提试剂盒提取质粒, 进行PCR鉴定和单双酶切(*Nru I* + *BamH I*)鉴定。将鉴定筛选出的阳性重组质粒命名为pMD19-T-BPII, 并送成都擎科梓熙生物技术有限公司测序鉴定。

生物信息学分析 测序后去除酶切位点及表达载体部分序列, 利用以下生物信息学软件对扩增出的BPII序列进行分析: ProtParam蛋白质理化性质在线分析程序及ProtScale蛋白质疏水性分析软件(<http://expasy.org/tools/protparam.html>); 亚细胞定位分析软件(<http://www.genscript.com/psort.html>); 功能预测分析(<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun>); 蛋白保守功能域的预测(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>); 基因核苷酸序列和氨基酸序列的同源性分析(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>), 采用软件包MEGA 5.0中的Neighbor-Joining法(NJ)构建系统进化树^[13]; 蛋白质二级结构在线预测工具SSPro4.0(<http://download.igb.uci.edu/sspro4.html>); 蛋白质三级结构在线预测工具(<http://swissmodel.expasy.org/interactive>)。

重组表达质粒pTWIN1-BPII的构建与表达

通过测序正确的pMD19-T-BPII提取质粒, 使用限制性内切酶*Nru I*和*BamH I*进行双酶切并胶回收纯化, 同时将表达质粒pTWIN1也经同样双酶切和纯化。纯化回收的目的片段和pTWIN1进行T₄DNA连接酶体系16 °C连接过夜, 连接产物转化大肠杆菌DH5α后, 提取质粒进行PCR和双酶切鉴定, 构建正确的重组质粒命名为pTWIN1-BPII。将阳性pTWIN1-BPII质粒转化表达宿主菌BL21(DE3), 涂布于含Amp (100 μg/mL)的LB平板上, 37 °C培养12~16 h。挑取单菌落接种于含

Amp的LB液体培养基中(LB-Amp), 37 °C振荡过夜, 次日按1:100比例接种LB-Amp培养基, 待菌液OD₆₀₀值为0.6~0.8时加入终浓度为1.0 mmol/L的IPTG, 37 °C诱导4 h, 并进行SDS-PAGE, 观察目的蛋白的表达情况。

2 结果

2.1 斑点叉尾鲷抗菌肽基因的总RNA检测

利用Trizol-Reagent提取获得斑点叉尾鲷肾脏组织总RNA, 经紫外分析表明, D260/D280为1.85~2.00, 说明提取的总RNA未降解, 纯度高。用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测(图1), 可见28 S和18 S条带清晰。

2.2 目的片段的扩增、T克隆及表达载体连接鉴定

利用设计引物对斑点叉尾鲷抗菌肽 *BPI1* 进行PCR扩增, 扩增后1%琼脂糖凝胶电泳结果如图2-a所示。将PCR扩增产物经胶回收纯化后, 与pMD19-T载体连接获得阳性重组质粒并命名为pMD19-T-*BPI1*, 重组质粒经PCR鉴定和双酶切(*Nru* I + *Bam* H I)鉴定正确(图2-b), 之后送成都擎科梓熙生物技术有限公司进行测序。测序正确后进行重组质粒pTWIN1-*BPI1*的构建, 经PCR

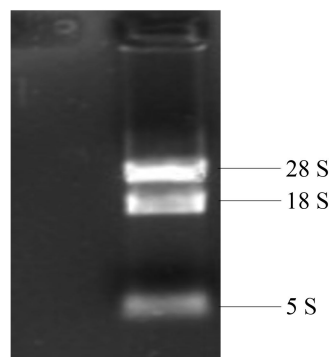


图1 斑点叉尾鲷肾脏总RNA提取结果检测
Fig. 1 The detection of total RNA from channel catfish kidney tissue

鉴定和双酶切(*Nru* I + *Bam* H I)鉴定正确(图2-c), 表明重组表达质粒pTWIN1-*BPI1*已构建成功。

2.3 *BPI1*基因的测序及序列分析

对阳性重组质粒T-*BPI1*测序结果表明, 斑点叉尾鲷抗菌肽 *BPI1* 截断基因全长669 bp, 与NCBI中斑点叉尾鲷抗菌肽 *BPI* 基因(GenBank登录号: AY816351)的氨基端相比完全一致, 无任何DNA异变。Editseq软件分析其碱基组成分别为A 26.16%、T 23.62%、G 26.91%、C 23.32%, 共编码223个氨基酸残基(图3)。全序列中(G+C) %含

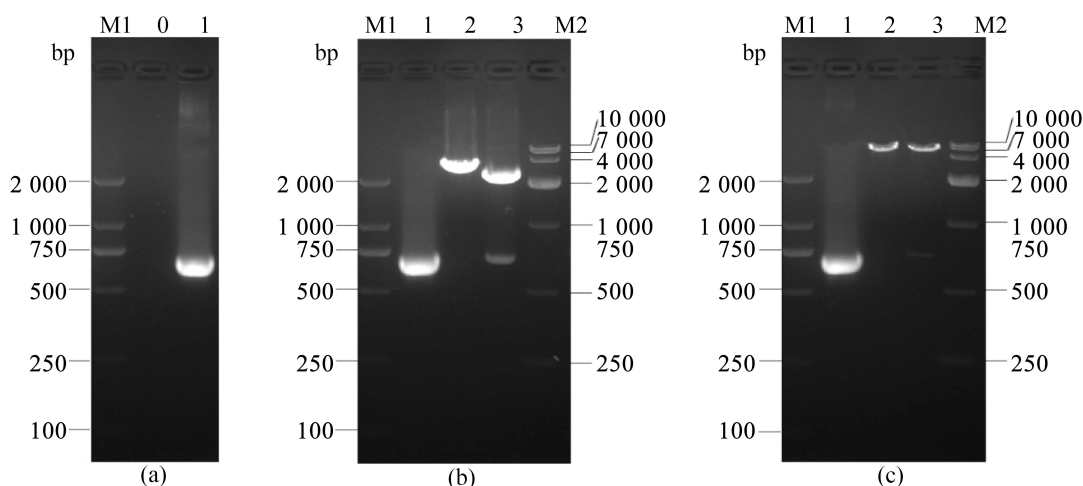


图2 斑点叉尾鲷抗菌肽 *BPI1* 基因PCR扩增(a)、重组质粒pMD19-*BPI1* (b)和重组表达质粒pTWIN1-*BPI1*的鉴定(c)

Fig. 2 Conformation of *BPI1* gene (a), pMD19-*BPI1* (b) and pTWIN1-*BPI1* (c) recombinant plasmid by PCR and restriction enzyme digestion

M1. DL2000; M2. DL10000; A-0. Negative control, A-1. *BPI1*-PCR; B-1. pMD19-T-*BPI1*-PCR, B-2. pMD19-T-*BPI1* digested by *Bam* H I, B-3. pMD19-T-*BPI1* digested by *Bam* H I + *Nru* I; C-1. pTWIN1-*BPI1*-PCR, C-2. pTWIN1-*BPI1* digested by *Bam* H I, C-3. pTWIN1-*BPI1* digested by *Bam* H I + *Nru* I

量为50.22%，略高于(A+T)%，推测该区域编码的DNA双链较为稳定。

2.4 BPI1基因的基本理化性质分析

应用瑞士蛋白质专家网ProtParam在线翻译工具预测表明，本实验克隆所得斑点叉尾鲷BPI1基因编码一条由223个氨基酸残基组成的多肽，其相对分子量约为25 ku，理论等电点为9.07，为碱性蛋白，分子式为 $C_{1085}H_{1763}N_{285}O_{323}S_6$ 。推导的BPI1基因氨基酸序列成分分析表明，该抗菌肽基因含有20种基本氨基酸，蛋白质中含量较高的氨基酸为Ser (12.1%)和Leu (11.7%)，含量较少的氨基酸为Cys (0.9%)和Trp (0.9%)。其中，非极性/疏水性氨基酸(Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val)93个，占氨基酸总数的41.7%；极性/亲水性氨基酸中，中性氨基酸(Asn, Cys, Gln, Gly, Ser, Thr, Tyr)81个，占36.3%，酸性氨基酸(Asp+Glu)20个和碱性氨基酸(Arg+Lys)25个，分别占8.9%和11.2%(图4)。该蛋白的脂肪族氨基酸指数为108.34，总平均亲水指数为0.058，不稳定指数为35.67，推测该蛋白属于亲水性的稳定蛋白。

```

1  GTGCGGAATGACATCTTGTACACAACGTTATCTAGAGTCACACAGAAAGGGACTCGAGTATGGTGT
1  N D I I V H N V I L R V T Q K G L E Y G R
70  CAGATTGGCCTGGTCCACCTACAGAAGAAGCTCAAACCGTCAAATCCCAGACATGAGCGGCTCGGAG
22  Q I G L V T L Q K K L K T V K I P D M S G S E
139  AAGGTGTCTCCCATAGGCAAAGTCTCGTATAGTCTGACAGGCATACAGATCTAGATCTCGGGTTGCC
45  K V S P I G K V S Y S L T G I Q I L D L G L P
208  AAGTCGGCTGTGGGTTGGTACTGGCACCAGGGTGGAGTCTGTCCATCGGGGATGCTCATTAACTG
68  K S A V G L V P G T G V S L S I G D A Y I N L
277  CATGGCAACTGAGGGTCAAATACCTCAGAATCATAAAGGACAGCGGATGCTGCACTTGCCGTTAGC
91  H G N W R V K Y L R I I K D S G S F D L S V S
346  GGACTCAGCATCAGCCACCTCAGCGTTAAAGGAGATGACACAGGGGCTCCGGTGGTCCAGCATGTCT
114  G L S I S A T I S V K G D D T G R P V V S S A
415  AACGTGTCAGCCTCTGTTGGCAATGCAAGATCAAGTTTCATGGAGGTGCCAGCTGTTGATAATCTG
137  N C A A S V G N V K I K F H G G A S W L Y N L
484  TTTAAGCACTACGAGAAAGGCTCGCGCAGTGAGCTACAGAAACAGATCTGTTCTGCTGGGCTGAA
160  F K H Y I E K A L R S E L Q K Q I C S L V A E
553  GCCATAGAGGAGATGAATCCCATCTGAAACTCTAAATGTTCTCGCGCAAGTTGACAAGTACGCTGAA
183  A I E E M N P H L K T L N V L A Q V D K Y A E
622  ATCGAGTATTCATGGTGGAGTCTCCGCTCATGCTAAATCAAGCATTGATCTCAGTTAAAGGGGGAG
206  I E Y S M V E S P L M S N S S I D L S L K G E
691  TTCTACGGATCC
229  F Y

```

图3 斑点叉尾鲷BPI1抗菌肽功能结构域测序的核苷酸及推断的氨基酸序列

双下划线表示NruI和BamHI酶切位点；单下划线为表达载体pTWIN1内含肽1的补加序列；方框表示脂多糖结合区域

Fig. 3 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of BPI1 active domain in channel catfish

Restriction enzyme site BamHI and NruI by double underline; the intein of pTWIN1 by single underline; LPS-binding domain by box

<http://www.scxuebao.cn>

2.5 疏水性分析

亲/疏水性预测结果显示(图5)，斑点叉尾鲷抗菌肽BPI1基因所编码的整个多肽链中，疏水性最大值为2.089，最小值为-1.911，且该多肽链序列中亲水区域远大于疏水区域，推测该蛋白可能是亲水蛋白，与理化性质分析结果一致。

2.6 亚细胞定位分析及功能预测分析

通过Psort程序对BPI1基因编码的蛋白质进行亚细胞定位分析发现，该蛋白定位大部分分布于线粒体(mitochondrial, 43.5%)，其余分布于细胞质(cytoplasmic, 30.4%)和细胞核(nuclear, 26.1%)，推测该蛋白可能在细胞内发挥生物学功能。

运用Protfun 2.2软件预测BPI1的功能分类。结果显示，该蛋白在嘌呤和嘧啶合成、能量代谢、辅因子生物合成、翻译以及复制和转录过程中发挥功能的可能性分别为0.242、0.207、0.183、0.135和0.104；6种酶类中作为氧化还原酶的可能性最大，为0.128；作为信号转导分子、转录因子、生长因子、运输蛋白、金属离子转运和结构蛋白的可能性分别为0.074、0.038、0.031、0.025、0.024和0.023，明显高于其他功能(表1)，表明推测BPI1可能在嘌呤和嘧啶合成以及能量代谢等过程中发挥信号转导、促进生长等重要作用。

2.7 蛋白功能域及保守结构域分析

保守结构域是生物进化或者一个蛋白家族中具有不变或者相同的结构域，具有重要功能，如结合底物、催化反应及活性调节等。通过NCBI的CDD工具分析发现，斑点叉尾鲷抗菌肽BPI1的223个氨基酸残基是一个BPI超家族(BPI super family)的保守结构域(图6)，该结构域不仅能中和革兰氏阴性菌外膜的脂多糖，还具有中和内毒素的功能。研究表明，BPI是外来刺激作用于细胞膜上的应急反应所产生的激素类似物质，因此，斑点叉尾鲷BPI1抗菌肽基因可能属于诱导型表达，推测抗菌肽BPI1可能是外界刺激产生的一种生物活性肽。

2.8 蛋白二级及三级结构预测

多肽链主要借助氢键排列呈现有规则重复的构象即是蛋白的二级结构，且在二级结构的基础上借助各种次级键卷曲折叠成特定的球状分子结构的构象，从而发挥正常的生物学功能。

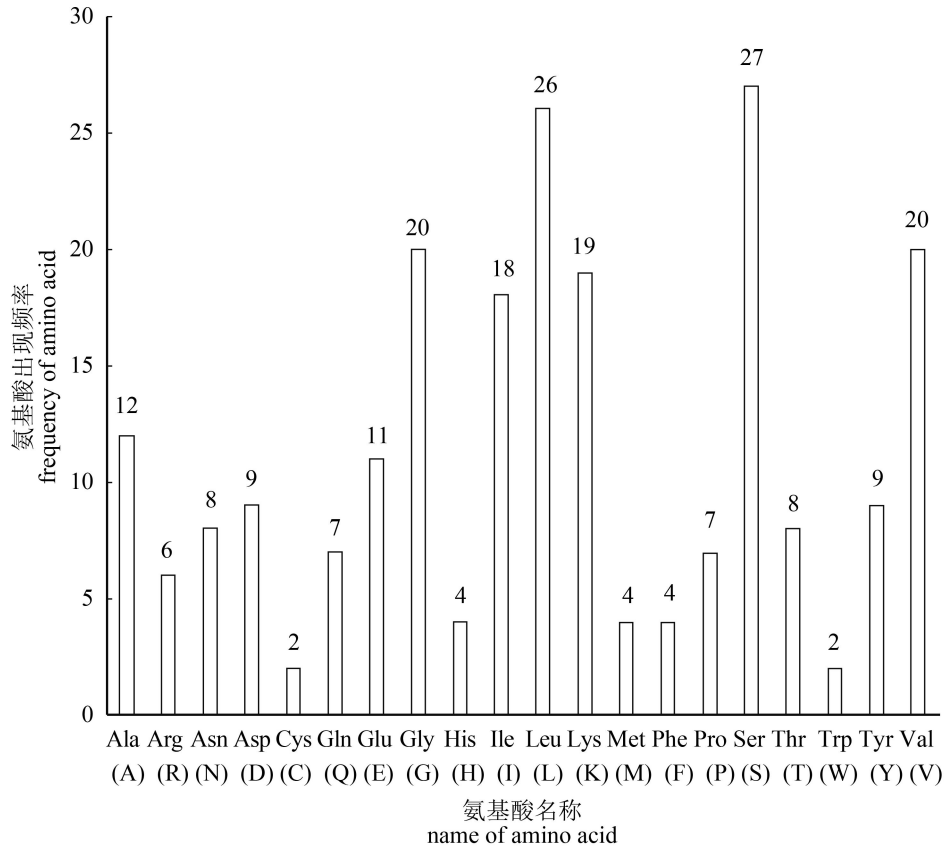


图 4 *BPI1* 基因推导氨基酸序列组成分析

Fig. 4 Composition analysis of deduced amino acid sequence of *BPI1* gene

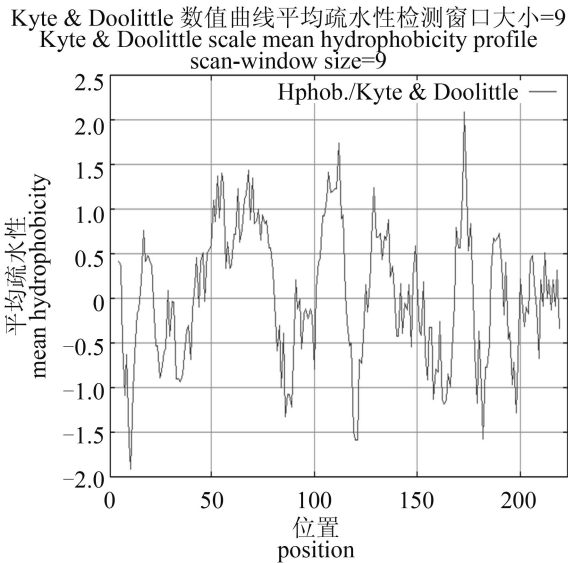


图 5 斑点叉尾鲷抗菌肽 *BPI1* 基因疏水性分析

Fig. 5 Hydrophathy profile of *BPI1* amino acids

通过SOMPA程序对*BPI1*二级结构预测, 结果表明(图7-a), *BPI1*氨基酸主要由 β -折叠(extended strand)构成, 其含量高达33.63%, 该结构更有利

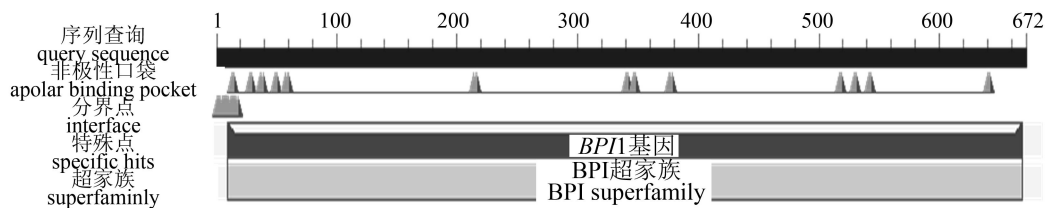
于*BPI1*抗菌肽构象的稳定。其次为 α -螺旋(alpha-helix)和无规则卷曲(random coil), 分别占29.15%和27.80%, 而 β -转角(beta turn)仅占9.42% (图7-a), 这些结构有利于形成螺旋结构, 可提高抗菌肽对膜的亲和力, 从而提高抗菌活性。通过SWISS-MODLE蛋白三级结构同源建模数据库进行3 D结构预测(图7-b), 由三级结构可推测斑点叉尾鲷抗菌肽*BPI1*是由 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲在外部包围成一个1字形的空间结构, 整个结构呈一根棒状。

2.9 同源性和进化树分析

多序列比对主要用于描述一组序列之间的相似性关系, 以便对序列的特征有一个简明扼要的了解。多序列比对与同源进化树构建表明, 斑点叉尾鲷抗菌肽*BPI1*基因氨基酸序列与NCBI中斑点叉尾鲷*BPI*基因(登录号AY816351)的氨基酸亲缘关系最近, 序列一致性为99.1%(图8-a), 进化树显示聚为一支, 且自引导值100支持(图8-b)。与鱼类相比, 斑点叉尾鲷抗菌肽*BPI1*与头头

表 1 *BPI1*功能分析结果Tab. 1 Analysis of *BPI1* function

功能分类 functional category	概率 probability	酶类 enzyme class	概率 probability	基因本体分类 probability	概率 probability
氨基酸生物合成 amino acid biosynthesis	0.012	氧化还原酶 oxidoreductase	0.128	信号转导分子 signal transducer	0.074
辅因子生物合成 biosynthesis of cofactors	0.183	转移酶 transferase	0.062	受体 receptor	0.021
细胞被膜 cell envelope	0.039	水解酶 hydrolase	0.071	激素 hormone	0.001
细胞加工 cellular processes	0.059	裂解酶 lyase	0.020	结构蛋白 structural protein	0.023
中央中间代谢 central intermediary metabolism	0.045	异构酶 isomerase	0.010	运输蛋白 transporter	0.025
能量代谢 energy metabolism	0.207	连接酶 ligase	0.070	离子通道 ion channel	0.017
脂肪酸代谢 fatty acid metabolism	0.054			电压激活离子通道 voltage gated ion channel	0.004
嘌呤和嘧啶 purines and pyrimidines	0.242			阳离子通道 cation channel	0.010
监管职能 regulatory functions	0.025			转录因子 transcription	0.038
复制和转录 replication and transcription	0.104			转录调控因子 transcription regulation	0.019
翻译 translation	0.135			应激反应 stress response	0.013
运输和结合 transport and binding	0.03			免疫反应 immune response	0.015
				生长因子 growth factor	0.031
				金属离子转运 metal ion transport	0.024

图 6 *BPI1*基因结构域分析Fig. 6 Domains analyses of *BPI1* gene

鲂 (*Megalobrama amblycephala*)、虹 鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)以及大西洋鳕 (*Gadus morhua*)更为相似，而与其他动物亲缘关系及一致性较低(图8)。

2.10 *BPI1*抗菌肽在pTWIN1表达载体中的原核表达

*BPI1*基因片段大小为669 bp，pTWIN1表达载体自带CBD标签与内含肽大小约为25 ku，以此构建的重组表达质粒pTWIN1-*BPI1*经IPTG诱导表达，获得了分子量约为50 ku的融合蛋白条带(图9)，与预期目的蛋白大小相符。空载体工程

菌株和未经诱导的基因工程菌均未出现相应条带，表明重组表达质粒pTWIN1-*BPI1*在BL21(DE3)中成功进行了表达。

3 讨论

杀菌/渗透-增强蛋白是一种内源性阳离子蛋白质，主要存在于多形核白细胞的嗜苯胺蓝颗粒中，也表达于嗜酸性粒细胞和单核细胞表面及黏膜和上皮细胞。*BPI*的结构呈一个独特的回旋状，包含*BPI1*(1~230个aa)和*BPI2*(250~456个aa)两个结构域，研究表明*BPI1*结构域完全具有抗菌活性以及中和内毒素的活性^[14-15]。为进一步

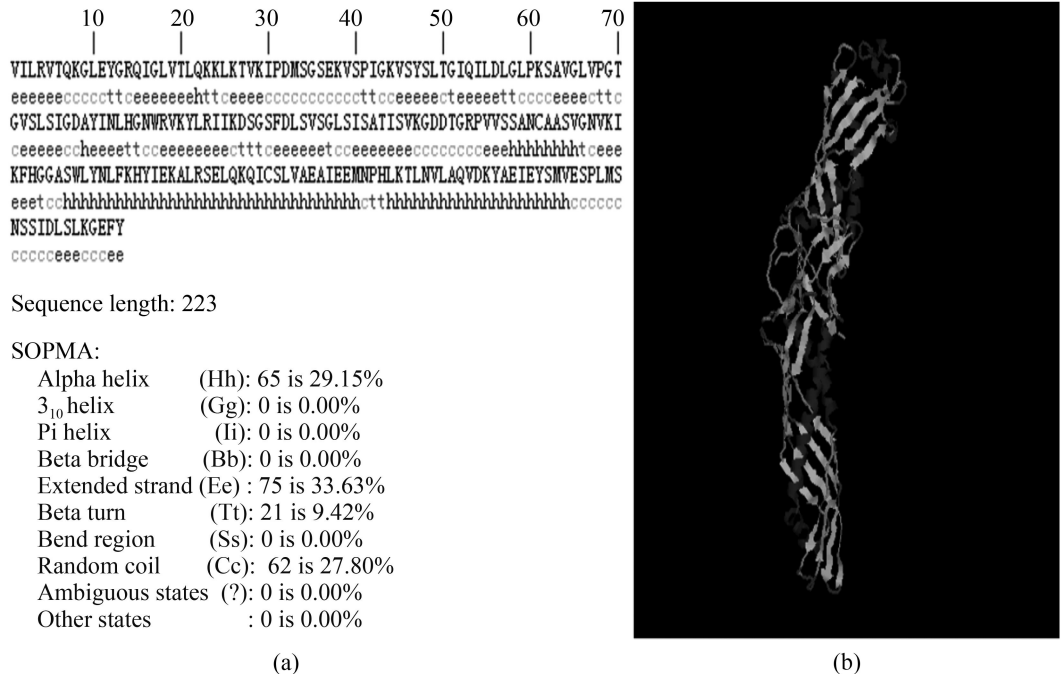


图 7 BPI1蛋白二级结构预测(a)及三级结构预测(b)

Fig. 7 BPI1 protein secondary structure prediction (a) and tertiary structure prediction (b)

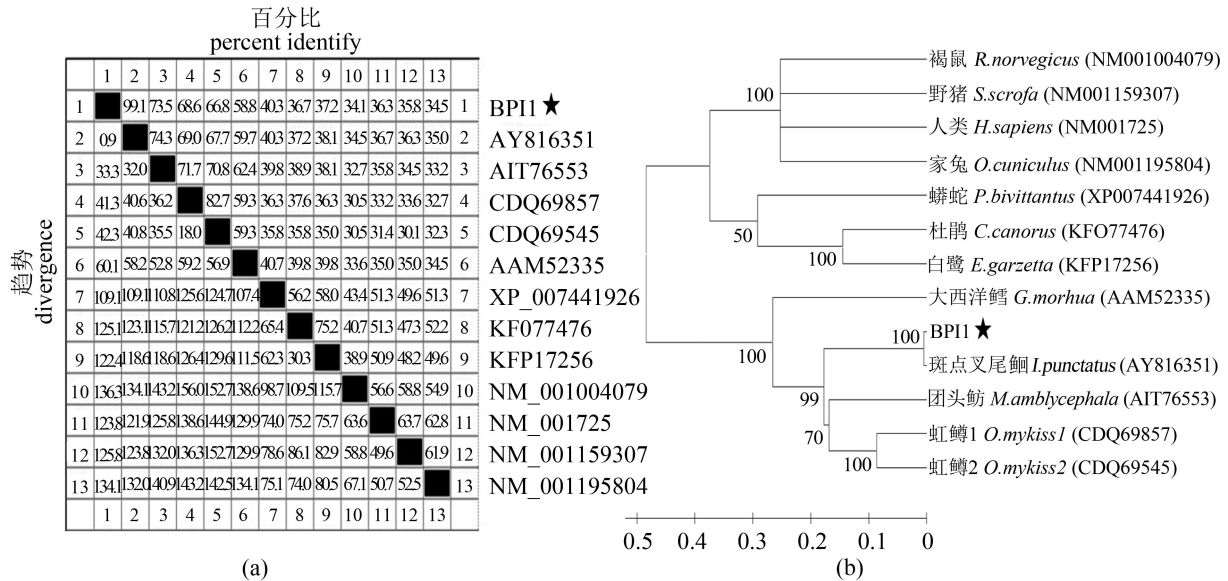


图 8 BPI1预测氨基酸序列与参考菌株的同源矩阵(a)与系统发育进化树(b)

Fig. 8 Homology analysis (a) and phylogenetic tree (b) for BPI1

探究BPI1基因编码的蛋白结构, 本实验通过RT-PCR从斑点叉尾鲷的肾脏中克隆到编码BPI1的cDNA片段, 并通过生物信息学分析发现, 斑点叉尾鲷抗菌肽BPI1编码223个氨基酸残基, 属于BPI超家族的保守结构域。其一级结构中带电残基散乱分布, 碱性氨基酸残基多于酸性氨基酸残基,

是稳定的亲水蛋白。二级结构预测表明该蛋白主要是以 α -螺旋和 β -折叠为主, 且 β -折叠较为丰富, 在蛋白质肽链中起交联作用, 可推测该结构化学性质较为稳定。三级结构推测BPI1是由 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲在外部包围成一个1字形的空间结构。对扩增的BPI1基因序列进行

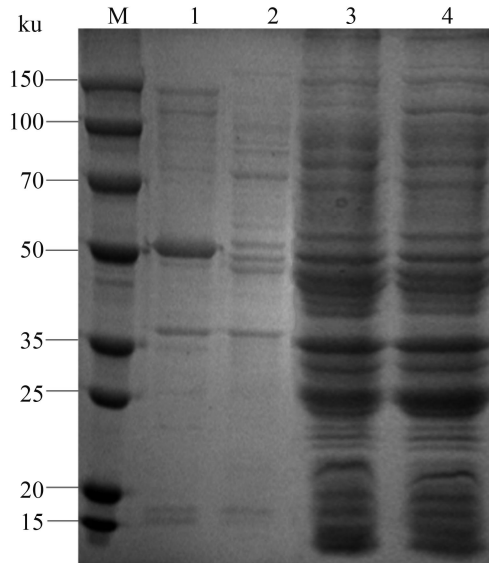


图9 BPII蛋白表达的SDS-PAGE图

M: 蛋白Marker, 1: BL21/pTWIN1-*BPII*诱导; 2: BL21/pTWIN1-*BPII*未诱导; 3: BL21/pTWIN1空载体未诱导; 4: pTWIN1空载体诱导

Fig. 9 SDS-PAGE analysis of pTWIN1-BPII expressed

M. protein molecular weight marker; 1. BL21/pTWIN1-*BPII* induced by IPTG; 2. BL21/pTWIN1-*BPII* non-induced by IPTG; 3. BL21/pTWIN1 non-induced by IPTG; 4. BL21/pTWIN1 induced by IPTG

同源性和进化树构建分析表明, 该基因与斑点叉尾鲷*BPI*基因(登录号AY816351)的氨基酸序列一致性高达99.1%, 进化树显示聚为一支, 而与团头鲂、虹鳟以及大西洋鲑等鱼类具有较高的同源性, 与其他动物亲缘关系及一致性较低, 表明*BPII*基因编码的蛋白序列在相同物种中的突变率较低, 保守性较高, 推测相同物种中*BPII*的活性与个体间的差异关系较小。

*BPII*的特殊结构与其功能密切相关。研究表明, *BPII*不仅能中和革兰氏阴性菌外膜的脂多糖, 还具有中和内毒素的功能。*BPII*基因编码的氨基酸残基中有65个连续氨基酸残基在空间结构上形成非极性脂质口袋, 使其具有较稳定的水溶性折叠结构, 且该结构域有利于与革兰氏阴性细菌细胞膜上带负电荷的脂多糖(LPS)之间的结合, 进而干扰了细胞膜上分子排列规律, 最终引起细菌膜通透性的改变, 进而杀灭细菌。*BPII*碱性氨基酸聚集成簇可介导*BPI*与内毒素靠近脂质A区域的酸性位点发生静电作用^[16], 进而中和内毒素。研究表明, *BPI*是外来刺激作用于细胞膜上的应急反应所产生的激素类似物质, 因而与受体可在低浓度下结合, 不参加具体的代谢过

程, 只对特定的代谢和生理过程起调节作用^[11]。因此斑点叉尾鲷*BPII*抗菌肽基因可能属于诱导型表达, 推测抗菌肽*BPII*可能是外界刺激产生的一种生物活性肽。

抗菌肽在活体动物中的含量较少, 单纯依靠分离天然抗菌肽远远不能满足商业生产的需要。因此, 基因工程技术便成为获取大量抗菌肽的理想途径。2004年, HORWITZ等^[17]将*BPI*的N端结构域进行融合蛋白表达, 结果证明了其N端结构域具有抗菌和中和内毒素的活性。2005年, PENG等^[18]报道了编码斑点叉尾鲷*BPI*基因的全长cDNA序列, 并通过RT-PCR检测了*BPI*基因在不同组织中的表达情况。2013年, 高北等^[19]通过RT-PCR和巢式PCR从斑点叉尾鲷的鳃中克隆了抗菌肽*BPI*氨基端活性结构域, 并成功构建了重组质粒pET-32 a (+)-*BPI*以及pET-28 a (+)-*BPI*。由于pET上含有多种标签, 在进行融合表达后需将标签切除才能得到有活性的抗菌肽, 但是切除标签的酶价格较为昂贵, 且过程复杂, 不适合获取大量有活性的抗菌肽。本实验利用自剪切表达载体pTWIN1^[20]成功构建重组表达质粒pTWIN1-*BPII*, 并诱导表达出大小为50 ku的CBD-*BPII*融合蛋白, 为大量获得斑点叉尾鲷抗菌肽提供了新的方法。

参考文献:

- [1] Zhong L, Song C, Chen X, *et al.* Channel catfish in China: Historical aspects, current status, and problems[J]. *Aquaculture*, 2016, 465: 367-373.
- [2] Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. Antimicrobial peptides: Key components of the innate immune system[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2012, 32(2): 143-171.
- [3] Li Y M, Xiang Q, Zhang Q H, *et al.* Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application[J]. *Peptides*, 2012, 37(2): 207-215.
- [4] Phoenix D A, Dennison S R, Harris F. Antimicrobial peptides: Their history, evolution, and functional promiscuity[M]//*Antimicrobial Peptides*. Weinheim: Wiley-VCH, 2013: 1-37.
- [5] Boman H G, Marsh J, Goode J A. *Antimicrobial Peptides*[M]. Chichester: John Wiley & Sons, 1994.
- [6] Weiss J, Elsbach P, Olsson I, *et al.* Purification and

- characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1978, 253(8): 2664-2672.
- [7] Stenvik J, Solstad T, Strand C, *et al.* Cloning and analyses of a BPI/LBP cDNA of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2004, 28(4): 307-323.
- [8] Kono T, Sakai M. Molecular cloning of a novel bactericidal permeability-increasing protein/lipopolysaccharide-binding protein (BPI/LBP) from common carp *Cyprinus carpio* L. and its expression [J]. *Molecular Immunology*, 2003, 40(5): 269-278.
- [9] Nam B H, Ahn K J, Kim Y O, *et al.* Molecular cloning and characterization of LPS-binding protein/bactericidal permeability-increasing protein (LBP/BPI) from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2010, 133(2-4): 256-263.
- [10] Kim J W, Gerwick L, Park C I. Molecular identification and expression analysis of two distinct BPI/LBPs (bactericidal permeability-increasing protein/LPS-binding protein) from rock bream, *Oplegnathus fasciatus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(1): 75-84.
- [11] Weiss J. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): Structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2003, 31(4): 785-790.
- [12] Solstad T, Stenvik J, Jørgensen T. mRNA expression patterns of the BPI/LBP molecule in the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(2): 260-271.
- [13] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [14] Mor A, Nicolas P. The NH₂-terminal alpha-helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(3): 1934-1939.
- [15] Ooi C E, Weiss J, Elsbach P, *et al.* A 25-kDa NH₂-terminal fragment carries all the antibacterial activities of the human neutrophil 60-kDa bactericidal/permeability-increasing protein[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(31): 14891-14894.
- [16] Gazzano-Santoro H, Parent J B, Conlon P J, *et al.* Characterization of the structural elements in lipid A required for binding of a recombinant fragment of bactericidal/permeability-increasing protein rBPI23[J]. *Infection and Immunity*, 1995, 63(6): 2201-2205.
- [17] Horwitz A H, Ammons W S, Bauer R J, *et al.* rBPI (10-193) is secreted by CHO cells and retains the activity of rBPI21[J]. *Journal of Endotoxin Research*, 2004, 10(2): 97-106.
- [18] Xu P, Bao B L, He Q, *et al.* Characterization and expression analysis of bactericidal permeability-increasing protein (BPI) antimicrobial peptide gene from channel catfish *Ictalurus punctatus*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2005, 29(10): 865-878.
- [19] 高北, 陶妍. 斑点叉尾鲷BPI抗菌肽的cDNA克隆及原核表达载体的构建[J]. *生物技术通报*, 2012(12): 131-138.
- Gao B, Tao Y. cDNA cloning and construction of prokaryotic expression vectors for channel catfish BPI antimicrobial peptide[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012(12): 131-138(in Chinese).
- [20] O'Reilly M S, Boehm T, Shing Y, *et al.* Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. *Cell*, 1997, 88(2): 277-285.

The prokaryotic expression for *BPI1* gene of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and its bioinformatics analysis

WANG Xingli¹, WANG Kaiyu^{1,2*}, CHEN Defang³, ZHU Jieyao³,
YANG Qian¹, HE Yang¹, WANG Erlong¹

(1. Fisheries Department, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province,

Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

3. College of Animal Science & Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: To research the characteristics and structural features of *BPI1* gene from channel catfish (*Ictalurus punctatus*), total RNA was extracted from channel catfish kidney tissue and reversely transcribed into cDNA. Specific primers were designed to clone the *BPI1* gene. Then *BPI1* gene was inserted into the prokaryotic expression vector pTWIN1. The successfully constructed vector pTWIN1-*BPI1* was transformed into BL21 (DE3) competent cells for prokaryotic expression. According to the analysis of SDS-PAGE, the recombinant expression vector pTWIN1-*BPI1* successfully expressed a 50 kDa fusion protein, which conformed to the expected size. *BPI1* gene sequence was studied by means of bioinformatics software. The results showed that *BPI1* nucleotide sequence encoded 223 aa, with an isoelectric point (pI) of 9.07, and belonged to *BPI* superfamily. It was a stable and soluble protein. Subcellular localization of *BPI1* was in the mitochondria (43.5%), cytoplasm (30.4%) and nucleus (26.1%), hence *BPI1* may play a role in signal transducer or promote growth, especially in the energy metabolism and cofactor biosynthesis like purines and thymine. The secondary structure of *BPI1* mainly consists of α -helices and beta-pleated sheet, besides, the tertiary structure of *BPI1* was a rod-like structure. The amino acid sequence was highly conserved and shared the highest homology with *BPI* of channel catfish, along with sequences identities 99.1% and the same branch in the phylogenetic tree. Thus *BPI1* gene sequence had lower mutation rate in the same species and had a strong conservative property that may have little impact on the bioactivity among individuals.

Key words: *Ictalurus punctatus*; *BPI1* gene; prokaryotic expression; bioinformatics

Corresponding author: WANG Kaiyu. E-mail: kywang1955@126.com

Funding projects: Sichuan Science and Technology Agency Application Foundation Project (2014JY0143); Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Teams in the University (IRT0848)