

Eukaryotic Expression and Purification of Mature Bovine Neutrophil β -Defensins 4

Jingjing Kang, Yuchen Wu, Zhengxing Yin, Qin Luo, Jun Huo*

Department of Veterinary Medicine, Henan University of Animal Husbandry and Economy (Longzihu Campus), Zhengzhou Henan
Email: kangjingjing111@163.com, *59992078@qq.com

Received: Oct. 9th, 2019; accepted: Oct. 22nd, 2019; published: Oct. 29th, 2019

Abstract

Bovine neutrophil β -defensins 4 (BNBD4) is one of the antimicrobial peptides which naturally exists in bovine pulmonary alveolar macrophages. In this study we will clone the CDs sequence of mature BNBD4 gene, and connect it to the eukaryotic expression vector pPIC9K to construct recombinant plasmid mBNBD4-pPIC9K, and purify it by Ni-sepharose after inducing expression. Finally, we can successfully obtain the recombinant protein mBNBD4 by Tricine SDS-PAGE detection and Western Blot identify, therefore to provide the experimental materials for the further study of mature BNBD4.

Keywords

Defensins, BNBD4, Mature Peptide, Eukaryotic Expression, Purification

牛防御素BNBD4成熟肽的真核表达及纯化

康静静, 吴玉臣, 阴正兴, 罗琴, 霍军*

河南牧业经济学院动物医药学院(龙子湖校区), 河南 郑州
Email: kangjingjing111@163.com, *59992078@qq.com

收稿日期: 2019年10月9日; 录用日期: 2019年10月22日; 发布日期: 2019年10月29日

摘要

牛 β 防御素4 (BNBD4)是一种天然存在于牛肺脏肺泡巨噬细胞内的抗菌肽, 本研究拟通过克隆BNBD4成熟肽片段的编码区序列, 连接至真核表达载体pPIC9K构建重组质粒mBNBD4-pPIC9K, 转化至毕赤酵母*通讯作者。

菌株GS115诱导表达, 镍柱纯化后, 经Tricine-SDS-PAGE检测和Western Blot鉴定, 成功获取重组蛋白mBNBD4, 为进一步研究牛防御素BNBD4的作用机制提供试验材料。

关键词

防御素, BNBD4, 成熟肽, 真核表达, 纯化

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

防御素是阳离子抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs)中最常见的类型之一[1] [2], 和其它抗菌分子一起存储于嗜中性粒细胞和巨噬细胞的细胞质颗粒中, 通过上皮细胞被分泌至细胞外环境中发挥作用, 因此防御素作为宿主早期防御系统的成员具有重要的抗感染作用[3]。1991年, β -防御素在牛舌上皮细胞中被首次发现[4], 随后又从牛中性粒细胞中分离到其它13种 β -防御素[5]。研究已证实牛肺泡巨噬细胞中共检测到4种 β -防御素基因的表达, 其中就包括BNBD4[6], 并且关于抗菌肽在分枝杆菌感染患者中的表达情况也说明抗菌肽类物质(包括防御素)具有发展成为新型抗结核药物的可能性[7] [8] [9]。

本研究拟采用真核表达的方法获取重组蛋白mBNBD4, 并通过镍柱纯化, 以及Tricine-SDS-PAGE和Western Blot方法检测验证, 为后续进一步研究BNBD4的作用机制提供试验材料。

2. 材料和方法

2.1. 材料

毕赤酵母宿主菌株GS115, 购自中国质粒载体菌株细胞株基因保藏中心; pPIC9K毕赤酵母表达载体, 购自美国Invitrogen公司; 无内毒素质粒DNA大量提取试剂盒, 购自美国OMEGA公司; 遗传霉素G418 (Geneticin), 购自美国INALCO公司; 镍离子琼脂糖蛋白纯化柱, 购自美国GE Healthcare公司; TOP10大肠杆菌感受态细胞, 购自北京天根生化科技有限公司。

2.2. 引物设计

根据GenBank上公布的BNBD4基因的CDs序列, 以及真核表达载体pPIC9K上的酶切位点EcoRI和NotI设计PCR引物, 为了方便以后的蛋白纯化, 设计时需在下游引物中插入一个6×His-tag序列[10] [11], 因此, 获得的PCR引物序列如表1所示。

Table 1. Primers for mature BNBD4 gene clone
表 1. BNBD4 成熟肽基因克隆引物序列

名称	引物
mBNBD4	F: 5-GCCGAATTC ^{EcoRI} CAAAGAGTAAGAAATCCTC-3
	R: 5-GCCGCGGCCGCTAATGATGATGATGATGCCTCCTGCAGCATGGT-3 ^{NotI} 6×His-tag

2.3. BNBD4 基因扩增

以正常牛肺脏 RNA 反转录后获得的 DNA 为模板进行 PCR 反应, 反应条件: 95°C, 1 min; 95°C, 20 sec, 62°C, 20 sec, 72°C, 30 sec (35 cycles); 72°C, 5min。琼脂糖凝胶电泳分析之后, 试剂盒回收 PCR 产物。

2.4. 真核表达载体的构建

使用内切酶 EcoR I 和 Not I 分别对 PCR 产物和表达载体 pPIC9K 进行双酶切后, 使用 T4 DNA 连接酶将 PCR 产物导入载体中, 并将连接产物转化至 TOP10 大肠杆菌感受态细胞, 转化完成后涂布 200 μ L 转化产物于平衡至室温的 LB/Amp⁺固体培养基培养板, 37°C 培养 14~16 h, 挑取 LB/Amp⁺固体培养基上的单克隆菌落, 大量培养后提取重组质粒 DNA, 进行双酶切鉴定后, 送检测序, 同时将构建好的重组载体命名为 pPIC9K-mBNBD4。

2.5. 阳性转化子的筛选及 PCR 鉴定

采用电转化方法分别将 5~20 μ g 纯化后的线性化质粒 DNA (pPIC9K-mBNBD4 和 pPIC9K) 转化至 100 μ L 新鲜制备的 GS115 感受态细胞中, 将转化液涂布于 MD 平板后置于 28°C 恒温培养箱中培养, 2 天以后观察转化子的生长情况, 生长出的单克隆即为 His⁺转化子。然后再依次对 His⁺转化子进行 G418 抗性(高拷贝转化子)筛选和 Mut⁺转化子(甲醇诱导型)筛选。筛选完成后, 根据真核表达载体 pPIC9K 上的通用引物序列和插入片段 mBNBD4 的引物序列合成两对引物, 以提取的毕赤酵母阳性转化子 DNA 为模板进行 PCR 鉴定。

2.6. 重组蛋白 mBNBD4 的诱导表达

将 PCR 鉴定后的阳性转化子首先接种于 10 mL 的 YPD 液体培养基中, 28°C 培养 16~18 h; 收集菌体后接种至 25 mL 的 BMGY 诱导表达前培养基中, 28°C 培养 18~24 h; 离心收集菌体接种至 200 mL 的 BMMY 诱导表达培养基中, 28°C 连续培养 4 天, 每隔 24 h 需补充甲醇至终浓度为 1%; 每隔 12 h 收集 1 mL 表达培养液, 离心取上清, Tricine-SDS-PAGE [12] 鉴定蛋白表达结果。

2.7. 重组蛋白 mBNBD4 的纯化及 Western Blot 鉴定

将大量诱导表达后的重组蛋白 mBNBD4 培养液离心取上清后, 通过镍离子琼脂糖蛋白纯化柱进行纯化。纯化后的 mBNBD4 重组蛋白首先使用 Tricine-SDS-PAGE 电泳进行分离检测, 然后再使用鼠抗 6 \times His-tag 单克隆抗体进行 Western Blot 鉴定。

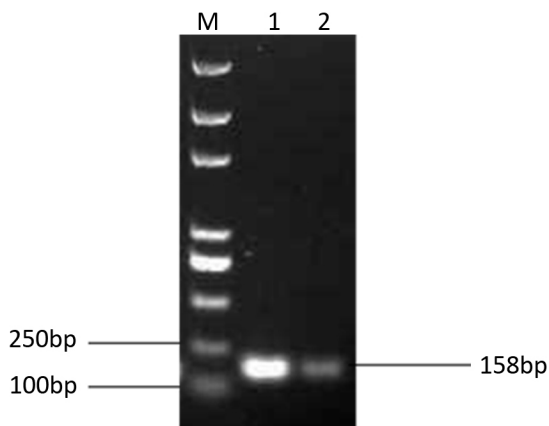
3. 结果

3.1. mBNBD4 基因的 PCR 扩增结果

以正常牛肺脏组织 RNA 反转录后获得的 DNA 为模板, 以 mBNBD4 基因的上游引物和下游引物进行 PCR 扩增, 获得的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果发现在 158 bp 处有一与 mBNBD4 大小一致的特异性条带(见图 1)。

3.2. mBNBD4 目的基因和真核表达载体 pPIC9K 的双酶切结果

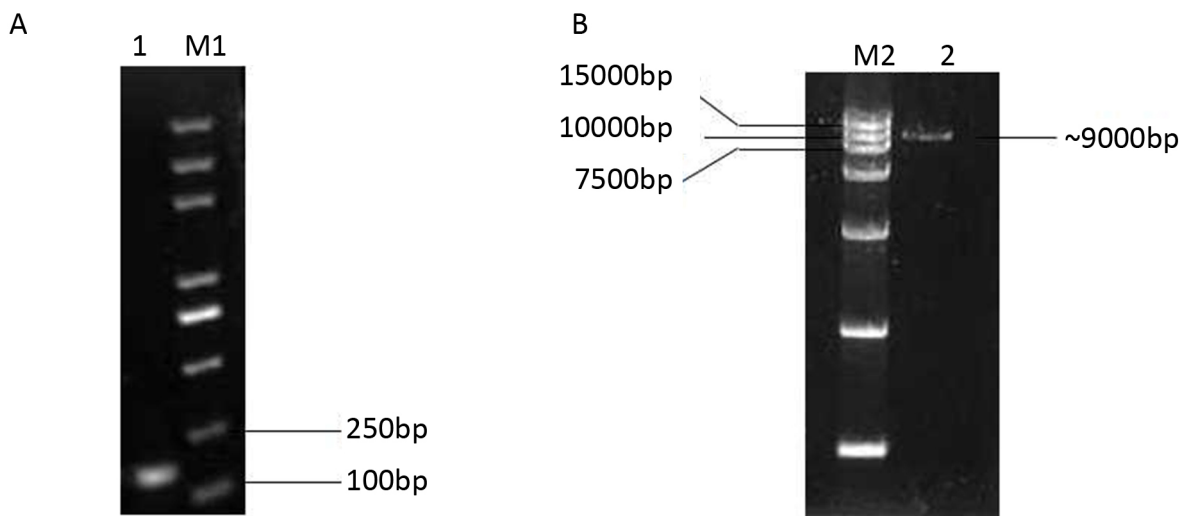
分别将 mBNBD4 的特异性 PCR 产物和真核表达载体 pPIC9K 使用限制性内切酶 EcoR I 和 Not I 进行双酶切, 酶切完成后使用琼脂糖凝胶对酶切产物进行电泳检测, 结果发现凝胶上均有与目的大小一致的特异性条带(见图 2)。



M: DNA marker; 1、2: mBNBD4 的 PCR 扩增产物

Figure 1. PCR amplification of mBNBD4 gene

图 1. mBNBD4 基因的 PCR 扩增结果



M1: Trans2000 DNA marker; 1: mBNBD4 双酶切产物; M2: BM15000 DNA marker; 2: pPIC9K 双酶切产物

Figure 2. Identification of mBNBD4 and pPIC9K by restriction enzyme digestion

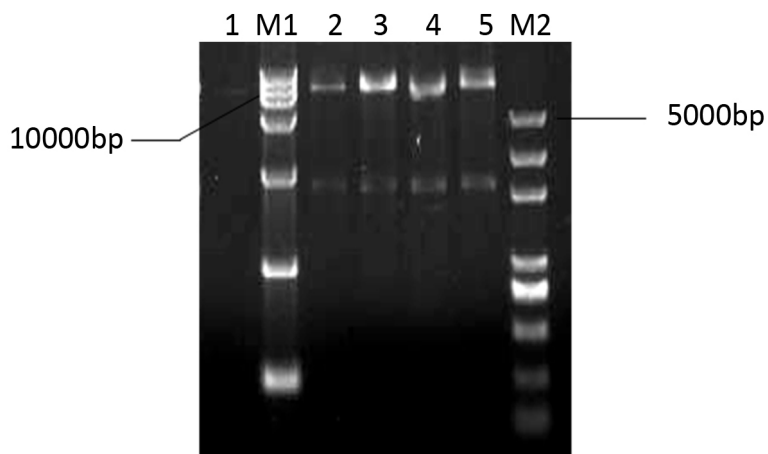
图 2. mBNBD4 和 pPIC9K 的双酶切鉴定结果

3.3. 重组质粒 pPIC9K-mBNBD4 的酶切鉴定结果和测序结果

分别将双酶切鉴定后的 mBNBD4 目的基因和真核表达载体 pPIC9K 切胶回收, 再进行连接转化, 构建重组质粒 pPIC9K-mBNBD4。然后将筛选出来的阳性克隆(共 4 个)提取质粒 DNA, 并使用 EcoR I 限制性内切酶进行单酶切鉴定, 同时以空载体作对照, 酶切后的产物使用琼脂糖凝胶电泳检测, 结果在预期位置有目的条带存在(见图 3)。

选取酶切鉴定后的重组质粒 pPIC9K-mBNBD4 的菌液送至测序公司测序, 所用测序引物为表达载体 pPIC9K 的通用引物 3'AOX1 和 5'AOX1。测序完成后, 使用 DNAMAN 软件将测序结果与 Genbank 上公布的 mBNBD4 基因序列进行比对分析, 结果发现二者的核苷酸序列同源性为 100%, 无错配现象, 表明目的基因克隆成功(见图 4)。

根据重组质粒 pPIC9K-mBNBD4 的测序结果, 可知目的基因牛防御素 4 成熟肽已经成功插入真核表达载体 pPIC9K 的酶切位点 EcoR I 和 Not I 之间, 表明真核重组质粒 pPIC9K-mBNBD4 已构建成功(见图 5)。



M1: BM15000 DNA marker; M2: Trans2000 DNA marker; 1: 空载体对照; 2~6: pPIC9K-mBNBD4 单酶切产物。

Figure 3. Identification of recombinant expression vector pPIC9K-mBNBD4 by restriction enzyme *EcoR* I

图 3. 重组表达质粒 pPIC9K-mBNBD4 的单酶切鉴定

```

seq identity= 100.00% (158/158) gap=0.00% (0/158)
1  GAATTCCAAGAGTAAGAAATCCTCAAAGCTGCCGTTGGAATATGGGTGCTGTATTCCG
   |||
336 GAATTCCAAGAGTAAGAAATCCTCAAAGCTGCCGTTGGAATATGGGTGCTGTATTCCG

61  TTCTTGTCCTGTAGGCATGAGACAGATTGGCACCTGTTTCGGGCCCGAGTACCATGC
   |||
396 TTCTTGTCCTGTAGGCATGAGACAGATTGGCACCTGTTTCGGGCCCGAGTACCATGC

121 TGCAGGAGGATCATCATCATCATCATTAGCGGCCGCG
   |||
456 TGCAGGAGGATCATCATCATCATCATTAGCGGCCGCGAATTAATTCGCCTTAGACATG
  
```

实线框: 限制性内切酶(EcoR I 和 Not I)序列; 虚线框: 6 × His-tag 序列。

Figure 4. Sequencing result of recombinant plasmid pPIC9K-mBNBD4

图 4. 重组质粒 pPIC9K-mBNBD4 的测序结果

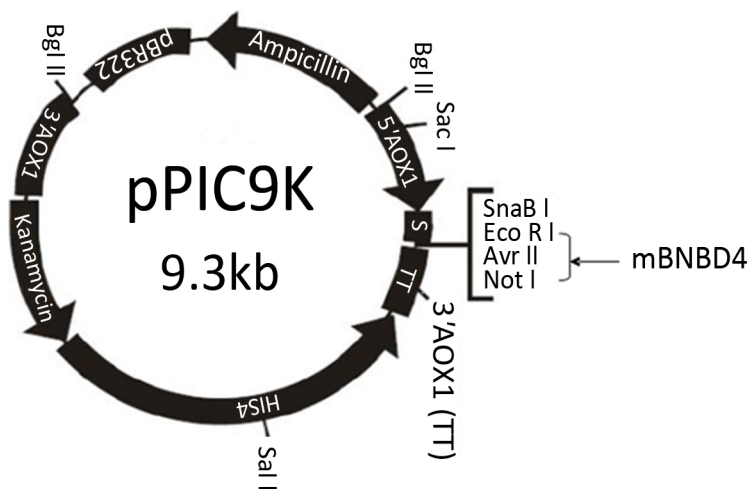


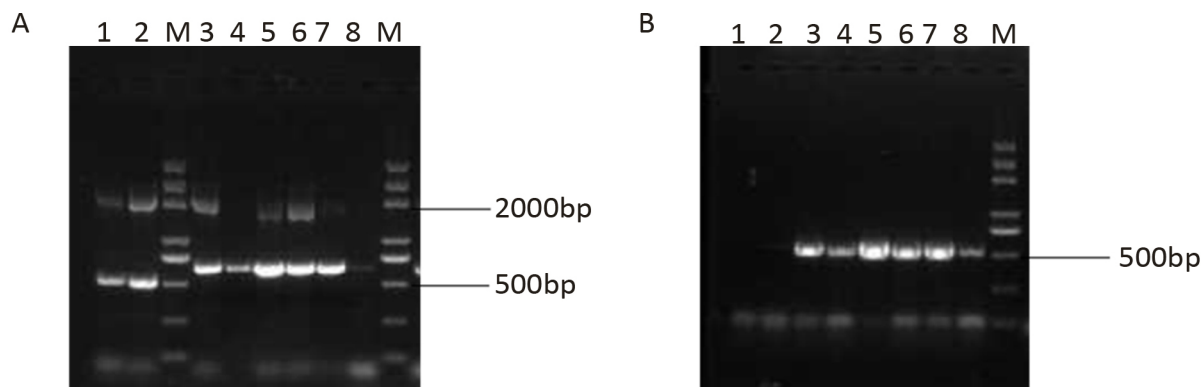
Figure 5. Construction of recombinant plasmid pPIC9K-mBNBD4

图 5. 重组质粒 pPIC9K-mBNBD4 的构建图示

3.4. 毕赤酵母 His⁺Mut⁺高拷贝转化子的筛选及 PCR 鉴定结果

通过筛选,我们共得到 6 株 pPIC9K-mBNBD4 的 His⁺Mut⁺高拷贝转化子,同时也筛选到了 2 株 pPIC9K 的 His⁺Mut⁺高拷贝转化子作为对照,将筛选到的菌株记录编号后,接种于 YPD 液体培养基中扩大培养,并保存菌种。

然后将筛选到的 6 株 pPIC9K-mBNBD4 的 His⁺Mut⁺高拷贝转化子扩大培养,提取酵母基因组,进行 PCR 鉴定,凝胶电泳检测结果发现在预期大小有目的条带存在(见图 6),说明转化至酵母基因组中的重组质粒是完整的,且目的基因 mBNBD4 已经被整合至酵母基因组。



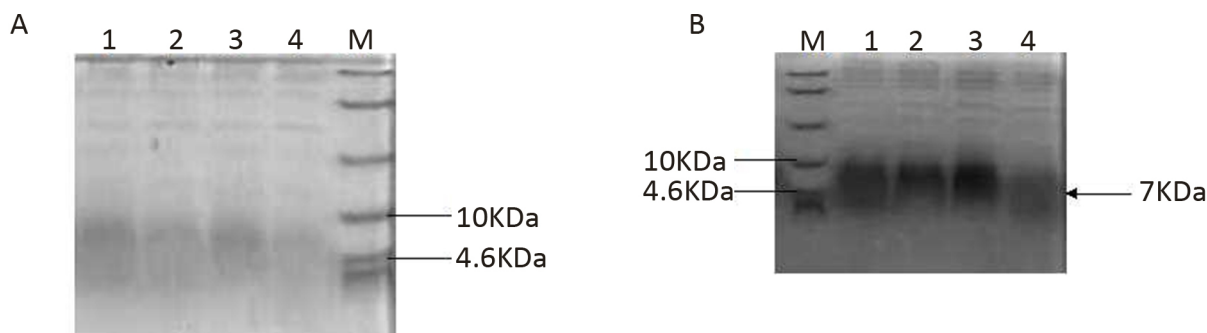
A: 使用 pPIC9K 通用引物的 PCR 验证结果; M: Trans2000 DNA marker; 1、2: 空载体对照; 3~6: 含有重组质粒 pPIC9K-mBNBD4 的基因组; B: 使用 mBNBD4 特异性引物的 PCR 验证结果; M: Trans2000 DNA marker; 1、2: 空载体对照; 3~6: 含有重组质粒 pPIC9K-mBNBD4 的基因组

Figure 6. PCR results of *Pichia* genome containing recombinant plasmid pPIC9K-mBNBD4

图 6. 含有重组质粒 pPIC9K-mBNBD4 的毕赤酵母基因组 PCR 鉴定结果

3.5. 重组蛋白 mBNBD4 的 Tricine-SDS-PAGE 分析结果

将诱导表达后的重组蛋白表达上清离心后进行 Tricine-SDS-PAGE 分析,同时以含有空载体 pPIC9K 的酵母菌作为诱导表达对照。结果发现,从诱导表达后 48 h 开始,重组质粒酵母表达上清中多出一条分子量大约为 7 KDa 大小的条带(见图 7)。该条带大小与预测的重组蛋白 mBNBD4 表达产物大小一致,说明重组蛋白 mBNBD4 在毕赤酵母 GS115 中以分泌形式表达至培养基上清中。同时,根据结果可知重组蛋白在 72 h 表达量最高。



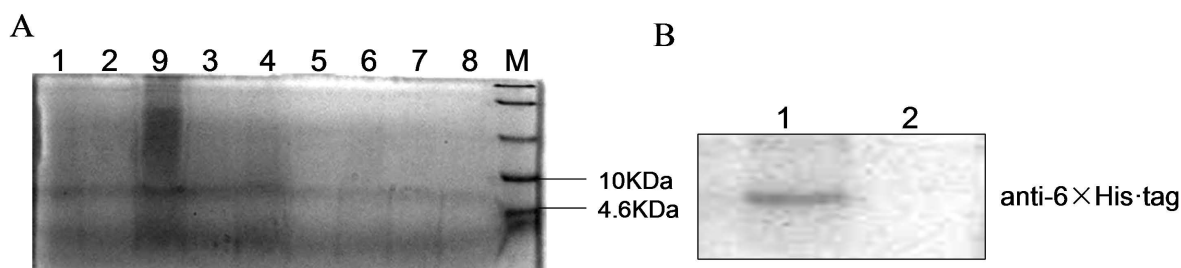
A: 含有空载体对照 pPIC9K 的酵母菌株的诱导表达结果; M: 蛋白 marker; 1~4: 分别为诱导表达后 48 h、60 h、72 h、84 h 的表达上清; B: 含有重组质粒 pPIC9K-mBNBD4 的酵母菌株的诱导表达结果; M: 蛋白 marker; 1~4: 分别为诱导表达后 48 h、60 h、72 h、84 h 的表达上清

Figure 7. Analysis of recombinant mBNBD4 protein expression by Tricine-SDS-PAGE

图 7. 重组蛋白 mBNBD4 的 Tricine-SDS-PAGE 分析

3.6. 重组蛋白 mBNBD4 的纯化结果和 Western Blot 鉴定结果

按照 3.5 中的重组蛋白诱导表达条件, 28℃ 条件下大量诱导表达重组蛋白。镍柱纯化后将蛋白进行 Tricine-SDS-PAGE 分析, 结果发现纯化后的重组蛋白 mBNBD4 仅呈现一条与目的蛋白大小一致的特异性蛋白条带(见图 8A), 说明重组蛋白纯化效果良好。为了进一步对重组蛋白的准确性进行鉴定, 使用鼠源抗 6 × His-tag 单抗检测纯化后的重组蛋白 mBNBD4。结果发现, 与空载体样品对照相比, 重组蛋白 mBNBD4 (见图 8B)样品能检测到单一条带。



A: Tricine-SDS-PAGE 分析结果。M: 蛋白 marker; 1~8: 重组蛋白纯化样品; 9: 重组蛋白纯化前对照; B: Western Blot 鉴定结果。1: 纯化后重组蛋白; 2: 空载体诱导表达对照

Figure 8. Analysis of purified recombinant proteins by Tricine-SDS-PAGE and Western Blot

图 8. 重组蛋白 mBNBD4 纯化后的鉴定结果

4. 讨论

鉴于防御素的性质和结构特点, 本研究中我们选择了更接近于真核细胞天然结构的毕赤酵母表达系统用于重组蛋白 BNBD4 的表达[13][14]。此外, 由于防御素在机体中发挥活性的主要为其成熟肽, 本研究通过构建牛防御素 4 成熟肽的真核表达质粒, 诱导表达后, 获得了含有重组蛋白 mBNBD4 的表达上清。将收集的表达上清通过镍柱纯化去除表达上清中的杂蛋白, 经 Tricine-SDS-PAGE 检测和 Western Blot 鉴定后, 发现只有单一目的条带存在, 说明重组蛋白纯化效果良好, 且纯化后的重组蛋白总量可达到 15~20 mg/L, 能够满足后续试验的需求。

综上所述, 本研究通过构建重组质粒 pPIC9K-mBNBD4, 并将其转化入毕赤酵母 GS115 细胞, 经过 His⁺转化子筛选, 高拷贝转化子筛选和 Mut⁺转化子筛选成功获得了含有目的基因 mBNBD4 的 His⁺Mut⁺高拷贝转化子。通过 PCR 鉴定了转化子的完整性和特异性, 成功获得了含有重组质粒 pPIC9K-mBNBD4 的毕赤酵母菌株。通过对重组菌株的诱导表达, 成功获得了重组蛋白 mBNBD4, 从而为进一步研究牛防御素 4 的作用机制提供了实验材料。

基金项目

河南省高等学校重点科研项目计划(18A230005); 河南牧业经济学院学术带头人(14021321)。

参考文献

- [1] Ganz, T. (2003) Defensins: Antimicrobial Peptides of Innate Immunity. *Nature Reviews Immunology*, **3**, 710-720. <https://doi.org/10.1038/nri1180>
- [2] Ganz, T., et al. (1985) Defensins. Natural Peptide Antibiotics of Human Neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*, **76**, 1427-1435. <https://doi.org/10.1172/JCI112120>
- [3] Hi, Z. and Spitznagel, J.K. (1966) Cationic Proteins of Polymorphonuclear Leukocyte Lysosomes. I. Resolution of Antibacterial and Enzymatic Activities. *Journal of Bacteriology*, **91**, 750-754.
- [4] Hi, Z. and Spitznagel, J.K. (1966) Cationic Proteins of Polymorphonuclear Leukocyte Lysosomes. II. Composition,

- Properties, and Mechanism of Antibacterial Action. *Journal of Bacteriology*, **91**, 755-762.
- [5] Ri, L. and Ganz, T. (2002) Defensins of Vertebrate Animals. *Current Opinion in Immunology*, **14**, 96-102. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(01\)00303-X](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(01)00303-X)
- [6] Ganz, T. (2004) Defensins: Antimicrobial Peptides of Vertebrates. *Comptes Rendus Biologies*, **327**, 539-549. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2003.12.007>
- [7] Mendez-Samperio, P. (2008) Role of Antimicrobial Peptides in Host Defense against Mycobacterial Infections. *Peptides*, **29**, 1836-1841. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.05.024>
- [8] Shin, D.M. and Jo, E.K. (2011) Antimicrobial Peptides in Innate Immunity against Mycobacteria. *Immune Network*, **11**, 245-252. <https://doi.org/10.4110/in.2011.11.5.245>
- [9] Dong, H., Lv, Y., Zhao, D., Barrow, P. and Zhou, X.M. (2016) Defensins: The Case for Their Use against Mycobacterial Infections. *Journal of Immunology Research*, **2016**, Article ID: 7515687. <https://doi.org/10.1155/2016/7515687>
- [10] 牛明福, 李翔, 邢广旭, 等. 6 × His-Tag 在抗菌肽表达纯化中的应用及其对抗菌肽活性的影响[J]. 河南农业科学, 2008(12): 121-124.
- [11] Patoli, A.A. and Patoli, B.B. (2019) The N-Terminal 6 x His Tag on β -Clamp Processivity Factor Occludes Gly66 and Affects the Growth of *Escherichia coli* B834 (DE3) Cells. *Molekuliarnaia Biologiia*, **53**, 32-37. <https://doi.org/10.1134/S0026893319010126>
- [12] Schagger, H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, **1**, 16-22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
- [13] Gasser, B., et al. (2013) *Pichia pastoris*: Protein Production Host and Model Organism for Biomedical Research. *Future Microbiology*, **8**, 191-208. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.133>
- [14] Daly, R. and Hearn, M.T. (2005) Expression of Heterologous Proteins in *Pichia pastoris*: A Useful Experimental Tool in Protein Engineering and Production. *Journal of Molecular Recognition*, **18**, 119-138. <https://doi.org/10.1002/jmr.687>