

抗菌肽 LL-37 重组载体的构建

罗祎敏,王淑敏,张凯华

(南华大学医学院 病理教研室,湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 从健康人的外周静脉血中获得人类基因组 DNA,扩增出抗菌肽 LL-37 的全长基因,插入原核表达载体 pQE-30 以获得重组表达载体 pQE-30/LL-37。 **方法** 用 NaI 法从健康人外周静脉血中提取人类基因组 DNA,然后以它为模板 PCR 扩增得到 LL-37 全长基因,酶切回收后连接。 **结果** 得到了较高品质的人类基因组 DNA,扩增得到了 LL-37 全长基因,成功构建了重组表达载体 pQE-30/LL-37。 **结论** 用生物方法生产抗菌肽是一种很有希望的产业,而抗菌肽 LL-37 的重组载体的构建成功为以后进一步的实验打下了基础。

关键词: 人类基因组 DNA; LL-37; 重组载体

中图分类号:R392

文献标识码:A

文章编号:2095-1116(2011)06-0643-03

Construction of LL-37 Recombinant Vector

LUO Yi -min, WANG Shu-min, ZHANG Kai-hua

(Medical College of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To derive human whole-genome DNA from peripheral venous blood of healthy people, to amplify the full-length genes of LL-37, to insert the prokaryotic expressing vector pQE-30 and to obtain the recombinant expression vector pQE-30/LL-37. **Methods** To derive human whole-genome DNA from the peripheral venous blood of healthy person by the means of NaI, and then the full-length genes of LL-37 will be amplified from the template of the acquired human whole-genome DNA. After the reabstraction of the restriction endonuclease from the agarose, LL-37 will be bonded with pQE-30. **Results** High quality human whole-genome DNA is obtained, and the recombinant vector pQE-30/LL-37 is constructed successfully. **Conclusion** Producing antimicrobial peptide LL-37 by the biologic method may be a promising industry, as the construction of antimicrobial peptide recombinant vector pQE-30/LL-37 can serve as a foundation to the further research.

Key words: human genome DNA; LL-37; recombinant vector

天然免疫是有效的宿主防御系统,是抵抗病原体侵袭的第一道屏障,抗菌肽是其中的重要组成部分。抗菌肽具有广谱抗病原体的作用,它对细菌、真菌、病毒等都有很强的杀伤作用,因此越来越受到研究人员的重视。

抗菌肽 LL-37 是新发现的一种抗菌肽,它是由其前体肽 hCAP-18 (Human cathelicidin antimicrobial peptide 18) 经丝氨酸蛋白酶 3 和其他蛋白水解酶酶解后释放出的有活性的 C 端片段,在生殖系统、呼吸系统、消化系统等处均可检测到它的表达^[1]。在

炎症发生部位,它的表达量迅速升高。它不仅能直接杀灭入侵的病原体,而且通过各种信号传导通路调动机体的主动免疫体系,从而增强免疫功能^[1~3]。

抗菌肽 LL-37 活性状态下呈现线性,因此,在大肠杆菌等微生物中表达后不会因为蛋白构象变化而影响活性,并且 LL-37 基因中没有内含子,所以可以直接扩增,不需要提取 RNA 反转录为 cDNA,为此,抽取人类基因组 DNA,用相应引物从中扩增出 LL-37 的全长基因,以 pQE-30 为载体构建了 LL-37 基因大肠杆菌表达载体。

1 材料与方法

1.1 健康人外周静脉血、菌株和材料

外周静脉血来自于健康成人,NaI 购自上海南翔试剂有限公司,DNA 分子量标准物、质粒提取试剂盒购自上海生工,DNA 凝胶回收试剂盒、限制性内切酶、T4 连接酶购自大连宝生物有限公司。Taq 2X Master Mix(快速 PCR 通用试剂)购自北京天为时代。工程菌 *E. coli* M15 由本研究所保存。其余为国产分析纯。

1.2 引物

根据 Genebank 人抗菌肽 FALL-39cDNA 序列(登录号:X96735),去除前六个碱基后设计特异引物: P_1 :5'-3' TAGGATCCATGCTGCTGGGTGATTTCT-TC; P_2 :5'-3' TTGTCGACTTAGGACTCGGTCCTGGG-TAC,选用的酶切位点分别为 *Bam*HI 和 *Sal*I,引物由上海生工合成。

1.3 NaI 法提取人类基因组 DNA

抽取 5 mL 健康人外周静脉血,用 2% EDTA 抗凝待用。从中取 100 μ L 于 EP 管中,12 000 rpm 离心 12 min,弃去上清,加双蒸水 200 μ L 溶解。混匀 20 s。再加 6 mol/L NaI 200 μ L,混匀 20 s。然后加氯仿/异戊醇(24:1)400 μ L,12 000 rpm 离心 12 min。取上层液 350 μ L,加入另一个新 EP 管中,再加入 0.6 体积的异丙醇,混匀,置室温 15 min,15 000 rpm 离心 12 min,70% 乙醇洗涤一次,去乙醇,在室温下干燥后加入 TE 30 μ L 溶解 12 h 以上,-20℃ 冻存备用。

1.4 PCR 扩增

测基因组 DNA 核酸浓度,取 1 μ g 加入到 12.5 μ L Taq 2X Master Mix 中,另加入引物 P_1 , P_2 各 1 μ L,加双蒸水至 25 μ L。反应条件:94℃ 预变性 5 min,然后进行 30 个 PCR 循环:94℃ 变性 1 min,64℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 40 s;最后在 72℃ 延伸 10 min。

1.5 重组载体的构建及转化大肠杆菌 M15

PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,在长波紫外灯下将含目的片段的凝胶切下来。使用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的基因(具体方法遵循该试剂盒操作说明书)。用 *Bam*HI 和 *Sal*I 两种限制性内切酶对回收后的 PCR 产物及 pQE-30 质粒进行酶切,分别用琼脂糖凝胶电泳,回收。再按照 1:4 的比例在 10 μ L 连接体系中 16℃ 连接过夜。

制作大肠杆菌 M15 感受态细胞,将连接产物转入 M15 感受态细胞中,再取 50 μ L 转化后的 M15 涂

布于含 60 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养皿上,37℃ 培养过夜。第二天挑取培养皿上的单克隆增菌培养,提取质粒鉴定(方法参考《分子克隆实验指南》)。

2 结 果

2.1 人类基因组 DNA 的提取

利用 NaI 法从健康人外周血中提取了人类基因组 DNA,其核酸浓度为 354 μ g/mL, A_{260}/A_{280} 值为 2.0。

2.2 抗菌肽 LL-37 基因的扩增

经 PCR 扩增后用 2.0% 琼脂糖电泳,获得了一条大小在 100 ~ 150 bp 之间的条带(图 1),与预计大小相符。

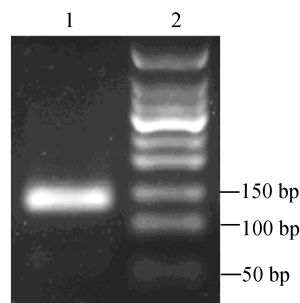


图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳
1:PCR 扩增产物;2:50 ~ 500 DNA Ladder

2.3 质粒以及 PCR 产物的酶切,连接,测序

pQE-30 质粒和 PCR 扩增产物分别用 *Bam*HI 和 *Sal*I 两种限制性内切酶酶切后(图 2)电泳回收,并在 16℃ 连接过夜,获得重组质粒 pQE-30/LL-37(图 3),并送上海生工用 pQE 载体通用测序引物进行测序,测序结果显示插入序列与 GeneBank 登录的 LL-37 基因的 cDNA 序列完全相同,且插入方向正确。

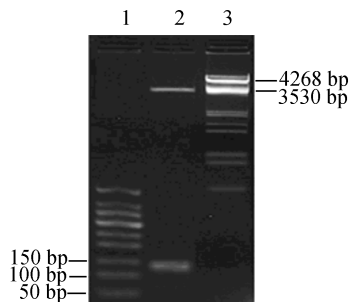


图 2 重组质粒酶切产物琼脂糖凝胶电泳

1:50 ~ 500 DNA Ladder;2:pQE-30/LL-37 重组质粒双酶切产物;
3:EcoRI + HindIII Marker

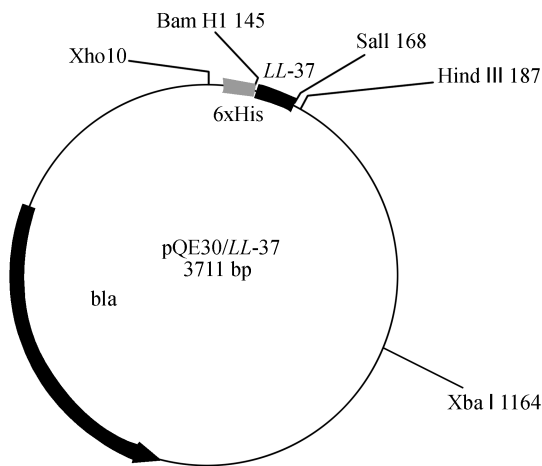


图3 重组质粒 pQE - 30/LL-37

3 讨 论

NaI 法是一种较理想的提取 DNA 的方法。该方法的主要原理就是 NaI 直接裂解血细胞,不需要收集细胞以及和裂解液共同孵育的步骤。氯仿、异戊醇能清除血红蛋白以及其他的变性蛋白。异丙醇的作用则是沉淀浓缩核酸。该方法的优点是简便、快速、经济、安全无毒,而且提取的 DNA 的量较多,不容易被打断,蛋白质以及 RNA 等杂质含量较少,完全可以用做 PCR 的模板以及用来做限制性酶切^[4]。

利用 NaI 法提取人类基因组 DNA,以它为模板 PCR 扩增得到了抗菌肽 LL-37 基因的全长序列。该基因是迄今为止发现的唯一一种存在于人体的 Cathelicidin 类抗菌肽,它是由其前体肽 Human cathelicidin antimicrobial peptide 18 (hCAP-18) 经丝氨酸蛋白酶 3 和其他蛋白水解酶酶解后释放出的有活性的 C 端片段。因其 N 端前两个氨基酸残基为亮氨酸(L)和氨基酸残基总数为 37 而得名。LL-37 在人体组织中广泛分布,具有广谱抗微生物作用、影响细胞因子表达、促进树突状细胞分裂、促进血管再生、趋化作用以及抗肿瘤效应^[4~7]。它是人体天然免疫的重要作用因子。最关键的是它是人体产生的内源性抗菌肽,没有耐受性产生,所以自发现以来倍受瞩目。然而,天然获得人源性抗菌肽的量极其有限,采用固相化学合成法成本很高,所以采取新的方法势在必行。由于 LL-37 不具有其他抗菌肽分子的

复杂的二级结构,为线性分子,在微生物表达后不存在构象问题而影响活性,因此可以扩增 LL-37 基因,并与原核表达载体连接,构建原核表达载体,这样就能源源不断地获得廉价的 LL-37 用于科学研究甚至产品生产。本研究所采用的 pQE-30 载体是目前使用较多的原核表达载体,拥有 T5 强启动子,具有较强的启动表达能力,且该载体表达的融合蛋白可以用 His 亲和层析柱纯化得到高度纯化的融合表达蛋白,所以可以方便地获得所需要的高纯度 LL-37 多肽。本结果为深入研究 LL-37 的结构与功能以及开发打下了良好的基础,并有可能成为抗菌肽研究开发的很有前途的一个选择。

参考文献:

- [1] Adrian R. Martineau, Katalin A. Wilkinson, Sandra M. Newton, et al. IFN- γ - and TNF-Independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: The Role of Cathelicidin LL-37 [J]. J Immunol, 2007, 178 (11) : 7190-7198.
- [2] 李方舟,胡海峰.人 cathelicidin 抗菌肽 LL-37 在宿主防御系统中的作用[J].世界临床药物,2011,32(4): 243-246.
- [3] Méndez-Samperio P. The human cathelicidin hCAP18/LL-37: a multifunctional peptide involved in mycobacterial infections [J]. Peptides, 2010, 31 (9) : 1791-1798.
- [4] Pompilio A, Scocchi M, Pomponio S, et al. Antibacterial and anti-biofilm effects of cathelicidin peptides against pathogens isolated from cystic fibrosis patients [J]. Peptides, 2011, 32 (9) : 1807-1814.
- [5] Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, et al. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines [J]. J Invest Dermatol, 2007, 127 (3) : 594-604.
- [6] An LL, Yang YH, Ma XT, et al. LL-37 enhances adaptive antitumor immune response in a murine model when genetically fused with M-CSFR (J6-1) DNA vaccine [J]. Leuk Res, 2005, 29 (5) : 535-543.
- [7] Bucki R, Namiot DB, Namiot Z, et al. Salivary mucins inhibit antibacterial activity of the cathelicidin-derived LL-37 peptide but not the cationic steroid CSA-13 [J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 62 (2) : 329-335.

(此文编辑 蒋湘莲)