

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2016.06.001

· 论 著 ·

细胞穿透肽 CCL 融合蛋白的构建与表达

刘 勇^{1,2}, 安艳芳², 王仲霞², 杨建业², 吴 君²

(1 南方医科大学深圳医院, 广东 深圳 518101; 2 湖北医药学院附属人民医院, 湖北 十堰 442000)

[摘要] 目的 评估细胞穿透肽 CCL 融合蛋白构建的可能性。方法 将 CCL6-PEP-6XHis 构建至 pABP 质粒, 然后提取 pABP-CCL6-PEP 质粒进行人胚肾 HEK293 细胞转染表达, 以及 CCL6-PEP-6XHis 蛋白层析纯化和检测。结果 成功构建并纯化细胞穿透肽 CCL 融合蛋白。将 CCL6-PEP-6XHis Tag 基因经 PCR 扩增、接入 T 载体、克隆、培养, 并提取质粒进行测序鉴定, 所得序列与目的基因一致。成功将 CCL6-PEP-6XHis 基因构建至哺乳动物细胞表达载体 pABP 中, 经质粒提取和酶切鉴定, 电泳结果显示, Hind III + Xba I 切出约 430 bp 的条带, 符合预期, 酶切鉴定正确。蛋白质印迹法 (Western Blot) 检测结果阳性, 表明纯化得到的目标蛋白带有 hisx6 标签。结论 细胞穿透肽 CCL 融合蛋白能够人工构建, 并通过真核细胞进行表达。

[关键词] 细胞穿透肽; CCL; 基因表达; 重组融合蛋白质

[中图分类号] R3 Q2-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2016)06-0361-06

Construction and expression of cell-penetrating peptide CCL fusion protein expression vector

LIU Yong^{1,2}, AN Yan-fang², WANG Zhong-xia², YANG Jian-ye², WU Jun² (1 Shenzhen Hospital of Southern Medical University, Shenzhen 518101, China; 2 Renmin Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the construction of expression vector for fusion protein of cell-penetrating peptide CCL (PEP-CCL). **Methods** CCL6-PEP-6XHis was inserted into plasmid pABP, pABP-CCL6-PEP plasmid was extracted and then transfected into HEK293 cells, CCL6-PEP-6XHis was expressed and purified by chromatography and detected with Western Blot. **Results** PEP-CCL express vector was successfully constructed and purified. PCR product of CCL6-PEP-6XHis Tag was ligated with T vector, recombinant was transferred into the host cells, then host cells were cultured, plasmid was extracted and sequenced, the sequence was identical to targeted gene. CCL6-PEP-6XHis was successfully inserted into the eukaryotic expression vector pABP, plasmid was extracted and digested, electrophoresis results revealed that a fragment with 430bp was digested by Hind III + Xba I, which was identical to the expected value. Western Blot revealed that CCL6-PEP fusion protein could be recognized by His monoclonal antibody. **Conclusion** PEP-CCL express vector can be constructed and expressed in eukaryotic cells.

[Key words] cell-penetrating peptide; CCL; gene expression; recombinant fusion protein

[Chin J Infect Control, 2016, 15(6):361-366]

由于多重耐药菌传播快, 开发新的抗菌药物迫在眉睫, 是重要的医学问题^[1]。抗菌肽 (antibacterial peptides) 是广泛存在于动植物体内, 具有一定抗

菌谱的小分子肽, 是哺乳动物抗感染防御中的重要成分, 可参与先天免疫和炎性应答诸多方面, 具有保守的信号转导通路^[2-6]。CCL6 是抗微生物肽

[收稿日期] 2015-08-23

[基金项目] 湖北省教育厅重点项目支持 (D20112101)

[作者简介] 刘勇 (1973-), 湖北省十堰市人, 男 (汉族), 副主任医师, 主要从事危重病研究。

[通信作者] 吴君 E-mail: 1091372776@qq.com

(AMP)的重要一员,在肠道等器官大量分布,易于提取,是具有临床潜力的药物之一^[7-8]。但 CCL6 由于分子小,易被蛋白酶降解,限制了其临床应用。利用新型技术提高抗菌肽的穿透力,是抗菌肽研究的热点和关键问题^[7,9]。假设细胞穿透肽也可以促进抗菌肽的定位及提高局部浓度,从而可大幅度提高抗菌肽的体内外抗菌活性。本研究评估构建细胞穿透肽 CCL6 融合蛋白的可能性。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 人胚肾 HEK293 细胞(ATCC, Catalog # CRL21573)为本研究室保存。大肠埃希菌 DH5 α 、质粒 pSectagA、pEGFP2C1、哺乳动物细胞表达载体 pABP、CD 293 TGE medium、(cat # CM-1156) BP fectin 转染试剂购自北京百普赛斯生物科技有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 CCL6-PEP-6XHis 基因密码子优化及合成 在 Pubmed 上查询 CCL6 及 PEP 蛋白基因序列,利用 Premier Primer 软件进行密码子优化后,设计合成的 CCL6-PEP-6XHis Tag 基因,再根据目的基因设计引物进行聚合酶链反应(PCR)。切胶回收目的片段,将 PCR 产物连入 T 载体,挑取克隆进行培养,提取质粒进行测序鉴定。通过比对,获得正确的 CCL6-PEP-6XHis 基因序列。

1.2.2 质粒 pABP-CCL6-PEP 重组和酶切、测序鉴定 CCL6-PEP 基因片段以 Hind III 和入 Xba I 双酶切,并与同样酶切的 pABP 载体于 14℃ 连接过夜,连接产物转入 50 μ L Top10 感受态细胞,挑取 4 个单菌落过夜振荡培养后,提取质粒并进行酶切鉴定。反应均按常规方法操作,利用 Primer 软件设计添加含 Hind III 和入 Xba I 酶切位点的 CCL6-PEP-6Xhis 的产物引物,并利用所设计引物进行 PCR。将 PCR 产物导入 pABP HindIII + Xba I 酶切线性化载体,再将连接产物转入 50 μ L Top10 感受态细胞,接种平板过夜培养,挑取若干单菌落过夜振荡培养后,提取质粒;对所提质粒进行 Hind III + Xba I 酶切鉴定,并进行测序鉴定。

1.2.3 CCL6-PEP-6XHis 质粒制备与瞬时转染 将鉴定正确的质粒转化到 DH5a 菌中,接种平皿挑取单菌落放大培养,并用 DNA 提取试剂盒制备转染用质粒 DNA。将 HEK293 细胞以 0.5×10^6 cells/mL 接种密度接种至 3 L 细胞培养反应器中,初始工作体积为 1.2 L,培养温度 37℃ 搅拌转速 150 r/min。当活细胞密度达 $(1.5 \sim 2.0) \times 10^6$ cells/mL 时,用 0.8 L 的新鲜无血清/化学成分界定培养基(CD 293 TGE medium)稀释至终体积为 2.4 L。活细胞密度稀释后 15 h 再度达到 $(1.5 \sim 2.0) \times 10^6$ cells/mL 时,用 BP fectin 作为转染试剂,以 3 μ L 转染试剂/ 10^6 细胞,和 1 μ L DNA/ 10^6 细胞的剂量转染细胞。转染复合物根据 ACRO Biosystems 说明书进行,并在转染 24 h 后,以 5%/5% (V/V) 比例加入 Feed X Supplement 补料,并在转染 24 h 和 96 h 后分别加入 ACRO Biosystems 20 mmol/L 及 4 mmol/L 葡萄糖和谷氨酰胺浓缩液。整个细胞培养过程中,每天观察计数细胞,并在转染后收获 HEK293 细胞培养液。

1.2.4 CCL6-PEP-6XHis 蛋白的层析纯化和检测 收集无血清细胞培养液,经低速离心去除细胞和细胞碎片,所得培养液上清采用 0.45 μ m 滤膜过滤、澄清,去除细胞碎片颗粒,使用 5 mL 金属螯合亲和层析进行分离,依次采用 40、100、250 和 500 mmol/L 咪唑阶段梯度进行洗脱,对洗脱物进行 SDS-PAGE 电泳检测。然后使用 Anti-hisx6 抗体对 Peak4(峰 4)进行蛋白质印迹法(Western Blot)检测。

2 结 果

2.1 CCL6-PEP-6XHis 基因密码子优化及合成 经过 Primer 软件进行密码子优化后,需要合成的 CCL6-PEP-6XHis Tag 基因见图 1~2。针对该序列共设计 18 条引物(CCL6-01、02……18)进行 PCR 扩增,切胶回收目的片段,连接 PCR 产物入 T 载体,挑取若干克隆进行培养,并提取质粒进行测序鉴定,所得序列符合目的基因。

```

atgaggaaacagcaagacagccatctccttcttcatcctggtggctgtgctgggcagccaggctgg
actgattcaggagatggagaaggaggacaggagatacaaccctccaatcatccaccagggttcc
aggacacc tctctgactgttgtttctcctatgccaccagattccatgcaagaggttcattac
actttccaacctctggaggctgcatcaagcctggcatcatcttcatcagcaggaggggcaccag
gtgtgtgctgacctatctgacaggagggtccagaggtgtctgagcaccctgaaacagggaccaag
gtctggcaacaaggtgattgccaaaggagacctgggtgggagacctgggtggacagagtggagccaac
caaagaagaagaggaaagtccatcaccaccaccaccactaa
    
```

蓝色部分:mouse CCL6 序列;红色部分:PEP1 序列;黄色部分:6XHis Tag 序列

图 1 CCL6-PEP-6XHis Tag 基因序列图

Figure 1 Sequence diagram of CCL6-PEP-6XHis Tag gene

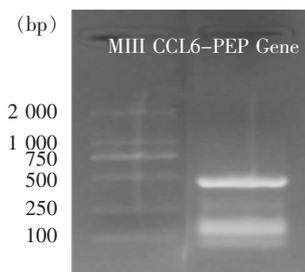


图 2 CCL6-PEP-6XHis 基因 PCR 产物电泳图

Figure 2 Electrophoretogram of PCR product of CCL6-PEP-6XHis gene

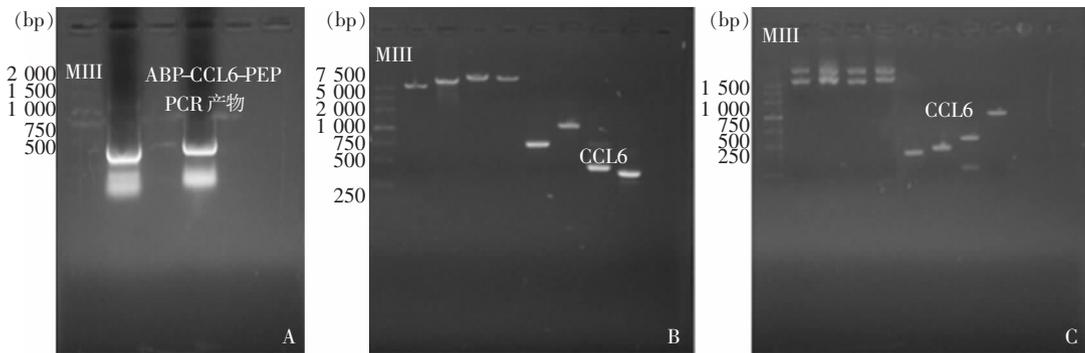
2.2 质粒 pABP-CCL6-PEP 重组 成功将 CCL6-PEP-6XHis 基因构建至哺乳动物细胞表达载体 pABP 中。设计载体构建引物,设计的引物进行 PCR 扩增。见表 1、图 3。

2.3 细胞转导 PCR 产物导入 pABP Hind III + Xba I 酶切线性化载体,再将连接产物转入 50 μL Top10 感受态细胞,接种平板过夜培养。隔夜培养平板培养出 >100 个单菌落。见图 4。

表 1 设计载体构建引物

Table 1 Construction of vectors and design of primers

蛋白	基因序列	备注
ABP-CCL6-PEPh-S1	ggAAGCTTatgaggaaacagcaagacagccatctccttcttcatcct	加入 Hind III 内切酶位点
ABP-CCL6-PEPh-S2	cctccttcttcatcctgggtggctgtgctgggcagcaggetg	-
ABP-CCL6-PEPh-AS	ggTCTAGAttagttagtgggtgggtgggtgatggactttcc	加入 Xba I 内切酶位点



A:PCR 粗产物;B:回收产物;C:酶切后产物

图 3 pABP-CCL6-PEP 基因 PCR、回收及酶切后产物电泳图

Figure 3 Electrophoretogram of PCR product, extracted PCR product, and restriction enzyme-digested PCR product of pABP-CCL6-PEP gene



图 4 质粒 pABP-CCL6-PEP 重组克隆隔夜培养平板

Figure 4 Overnight incubated plates of recombinant clones of plasmid pABP-CCL6-PEP

2.3.1 酶切鉴定 挑取 4 个单菌落过夜振荡培养后,提取质粒,对所提的 4 管质粒进行酶切鉴定,电泳结果显示,Hind III + Xba I 切出约 430 bp 的条带,符合预期,表明酶切鉴定正确。见图 5。

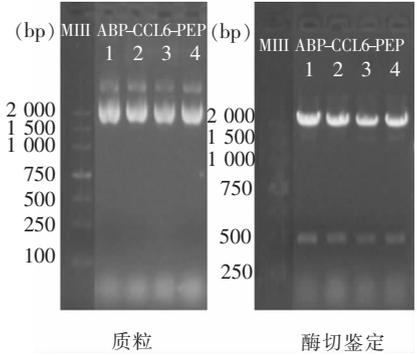


图 5 质粒 pABP-CCL6-PEP 及其酶切鉴定电泳图

Figure 5 Electrophoretogram of plasmid pABP-CCL6-PEP and restriction enzyme digestion

2.3.2 表达载体测序结果 对表达载体 pABP-CCL6-PEP 进行测序鉴定,比对结果表明,测序完全正确,符合设计。见图 6。

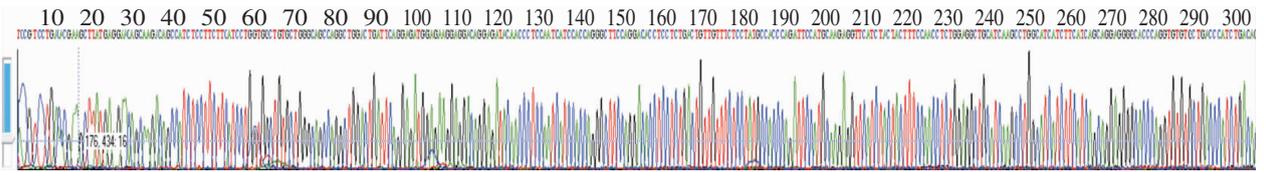


图 6 pABP-CCL6-PEP 基因测序图

Figure 6 Sequence diagram of pABP-CCL6-PEP gene

2.4 CCL6-PEP-6XHis 质粒制备与瞬时转染

2.4.1 CCL6-PEP-6XHis 质粒制备 将鉴定正确的质粒转化到 DH5a 菌中,接种平皿培养后挑取单菌落放大培养,并用 DNA 提取试剂盒制备转染用质粒 DNA。提取质粒名称 CCL6-PEP-6XHis, DNA 比光度为 1.82,数量为 13.2,转染 DNA 为 3.8 mg。

2.4.2 细胞培养与瞬时转染 细胞培养进行转染后的生长曲线见图 7。细胞峰活细胞密度 (Peak VCD) 达 4.8 million/mL,总细胞密度 (TCD) 达 7.66 million/mL,活细胞比 VCD/TCD 为 63%。

2.5 CCL6-PEP-6XHis 蛋白的层析纯化和检测

2.5.1 CCL6-PEP-6XHis 蛋白层析纯化 约 2.8 L 无血清细胞培养液经过 15 min 低速离心 (4 000 r/min) 去除细胞和细胞碎片,依次采用不同浓度咪唑阶段梯度进行洗脱,层析分离图谱见图 8。以上金属螯合亲和层析收集各洗脱峰,SDS-PAGE 还原电泳检测。峰 4(P4)为 500 mmol/L 咪唑洗脱后

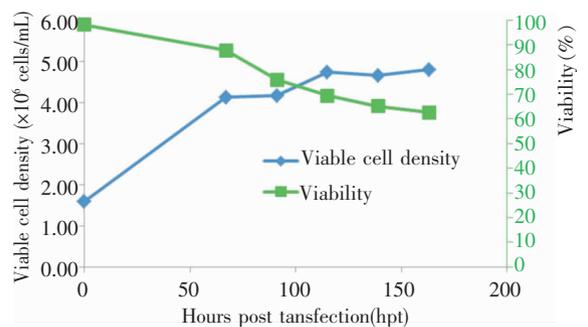


图 7 CCL6-PEP-6XHis 质粒在 HEK293 细胞中瞬时表达生长曲线

Figure 7 Growth curve of transient expression of plasmid CCL6-PEP-6XHis in HEK293 cell

所得目标蛋白。总细胞上清液为 2 650 mL,目标蛋白约 43 mL,根据紫外分光仪波长 280 nm 检测,目标蛋白低于最低检测阈值。

2.5.2 目标蛋白 SDS-PAGE 电泳分析 根据 SDS-PAGE 电泳分析 (见图 9),目标蛋白 (约 15 kD)

与金属螯合填料 (IMAC) 结合较强, 需使用 500 mmol/L 咪唑洗脱 (P4)。根据电泳条带估计,

纯化得到 0.05~0.1 mg 痕量目标蛋白, 当前方案的表达量较低。

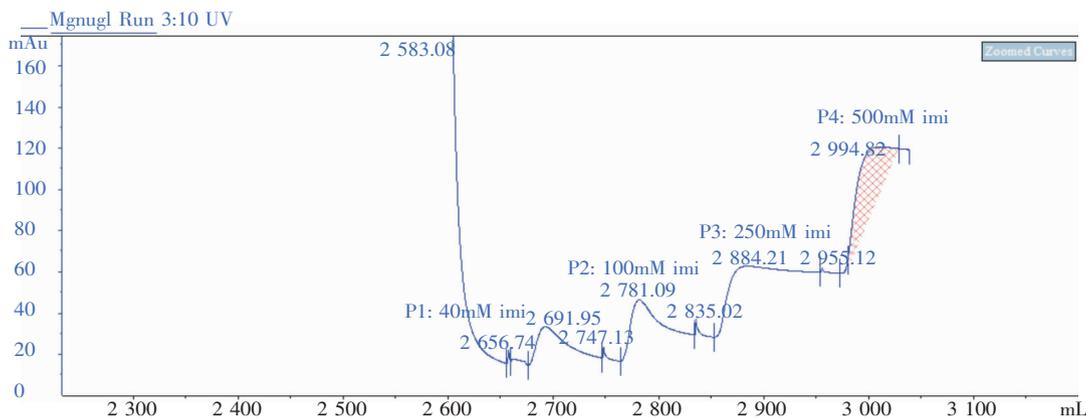
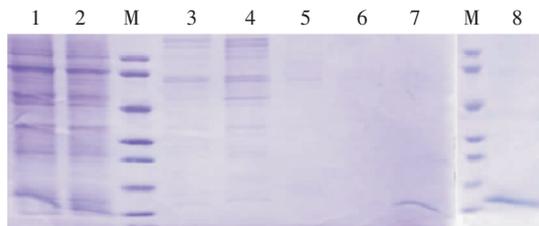


图 8 CCL6-PEP-6XHis 蛋白金属螯合亲和层析分离纯化层析图谱

Figure 8 Diagram of metal chelate affinity chromatography of CCL6-PEP-6XHis protein

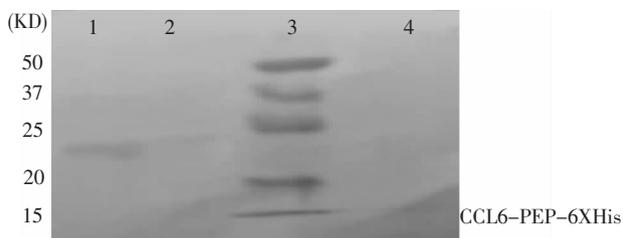


柱 M: 蛋白 Marker; 柱 1: 细胞培养上清液; 柱 2: 未洗脱前离心液; 柱 3—5: 分别为 40、100、250 mmol/L 咪唑洗脱后; 柱 6: 第三峰 (P3) 尾峰的 250 mmol/L 咪唑洗脱后; 柱 7—8: 500 mmol/L 咪唑洗脱后 (CCL-PEP-6XHis), 其中柱 8 采用 20 倍浓缩

图 9 CCL6-PEP-6XHis 蛋白层析分离纯化还原电泳分析图

Figure 9 Electrophoretogram of chromatographic separation and purification of CCL6-PEP-6XHis protein

2.6 CCL6-PEP-6XHis 蛋白 Western Blot 检测
使用 Anti-hisx6 抗体对 P4 进行 Western Blot 检测, 结果确定为阳性, 表明纯化得到的目标蛋白带有 hisx6 标签, 但由于浓度较低, 显色条带肉眼观察较浅。见图 10。



1 泳道: 阳性对照; 2 泳道: 空白对照; 3 泳道: Marker; 4 泳道: 洗脱后的 P4

图 10 CCL6-PEP-6XHis 蛋白 Western Blot 检测结果

Figure 10 Western Blot analysis on CCL6-PEP-6XHis protein

3 讨论

多重耐药菌是临床期待解决的问题。肠道分泌的 CCL6 具有广泛抗病原体作用, 且对人体无害, 是一种理想的候选抗菌药物^[7,10-12]。但 CCL6 由于分子小, 易被蛋白酶降解, 限制了其临床应用。利用新型技术提高抗菌肽的穿透力, 是抗菌肽研究的热点和关键问题。本研究成功构建了细胞穿透肽 CCL6 融合蛋白, 为进一步高表达目的蛋白及体内外实验奠定了基础。

研究^[13]表明, HEK293 细胞是比较理想的宿主细胞。本课题中的 CCL6 由于具有杀菌作用, 不宜于采用传统的大肠埃希菌培养。初试中载体细菌起初浓度呈指数增加, 但随时间进展, 尤其 3 d 后数量又呈指数下降, 大肠埃希菌表达的 CCL6 由于自身的杀伤作用导致产量低下。表明 CCL6 具有强大的杀菌作用, 且与浓度呈正相关, 大肠埃希菌并非其理想表达系统。由于 CCL6 机制主要为破坏细菌细胞壁, 因而对细胞无损伤^[10]。本组研究采用 HEK 293 细胞作为宿主细胞, 避免了对宿主的破坏, 提高了蛋白的产出率。

CCL6 的最低抑菌浓度值较高, 达到理想杀菌效果的浓度需 100 nmol 左右, 表明 CCL6 的细胞壁穿透能力有待进一步提高。该浓度的 CCL6 价格昂贵, 限制了其在临床广泛使用。因而增强 CCL6 的透壁能力十分必要。PEP-1 是一种穿透蛋白, 能

够增强靶分子的细胞壁穿透能力。既往研究^[14-15]表明, PEP-1 能够增强靶蛋白的穿透能力, 提高生物活性, 如 SOD, EGFP 和过氧化氢酶等。理论上 PEP-1 可以提高 CCL6 的穿壁能力, 但能够提高 CCL6 的穿壁能力是否一定提高杀菌能力尚需要进一步研究。本研究为进一步评估 CCL6 的杀菌机制, 开发新一代抗菌素奠定了技术基础。本研究的限制之处为靶蛋白的浓度和产量还不够高, 未来实验中需要予以进一步改良和优化。

[参 考 文 献]

- [1] Wittekamp BH, Bonten MJ. Antibiotic prophylaxis in the era of multidrug-resistant bacteria [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012, 21(6): 767 - 772.
- [2] Vila-Farrés X, Giral E, Vila J. Update of peptides with anti-bacterial activity [J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19 (36): 6188 - 6198.
- [3] Liao Z, Wang XC, Liu HH, et al. Molecular characterization of a novel antimicrobial peptide from *Mytilus coruscus* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34 (2): 610 - 616.
- [4] Gottschalk S, Gottlieb CT, Vestergaard M, et al. Amphibian antimicrobial peptide fallaxin analogue FL9 affects virulence gene expression and DNA replication in *Staphylococcus aureus* [J]. *J Med Microbiol*, 2015, 64(12): 1504 - 1513.
- [5] Chen B, Fan DQ, Zhu KX, et al. Mechanism study on a new antimicrobial peptide Sphistin derived from the N-terminus of crab histone H2A identified in haemolymphs of *Scylla paramamosain* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 47(2): 833 - 846.
- [6] Goh HF, Philip K. Purification and characterization of bacteriocin produced by *Weissella confusa* A3 of dairy origin [J]. *PLoS one*, 2015, 10(10): e0140434.
- [7] Kotarsky K, Sitnik KM, Stenstad H, et al. A novel role for constitutively expressed epithelial-derived chemokines as anti-bacterial peptides in the intestinal mucosa [J]. *Mucosal Immunol*, 2010, 3(1): 40 - 48.
- [8] Liu JY, Li F, Wang LP, et al. CTL-vs Treg lymphocyte-attracting chemokines, CCL4 and CCL20, are strong reciprocal predictive markers for survival of patients with oesophageal squamous cell carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2015, 113(5): 747 - 755.
- [9] Zhang YE, Wang JN, Tang JM, et al. In vivo protein transduction: delivery of PEP-1-SOD1 fusion protein into myocardium efficiently protects against ischemic insult [J]. *Mol Cells*, 2009, 27(2): 159 - 166.
- [10] Bukharin OV, Valyshev AV. mechanisms of resistance of *enterococci* to antimicrobial proteins and peptides [J]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 2012, 5: 89 - 94.
- [11] Corrales-Garcia L, Ortiz E, Castañeda-Delgado J, et al. Bacterial expression and activities of recombinant variants of human β -defensins on pathogenic bacteria and *M. tuberculosis* [J]. *Protein Expr Purif*, 2013, 89 (1): 33 - 43.
- [12] Hu H, Wang C, Guo X, et al. Broad activity against porcine bacterial pathogens displayed by two insect antimicrobial peptides moricin and cecropin B [J]. *Mol Cells*, 2013, 35(2): 106 - 114.
- [13] Chumanov RS, Kuhn PA, Xu W, et al. Expression and purification of full-length mouse CARM1 from transiently transfected HEK293T cells using Halo Tag technology [J]. *Protein Expr Purif*, 2011, 76(2): 145 - 153.
- [14] 黄光庆, 王家宁, 唐俊明, 等. 细胞穿透肽 PEP-1 介导过氧化氢酶转导大鼠心肌 H9C2 细胞 [J]. *鄞阳医学院学报*, 2010, 29(2): 103 - 107.
- [15] 张永军, 王家宁, 唐俊明, 等. PEP-1-CAT 融合蛋白预处理对在体大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29(12): 2429 - 2432.

(本文编辑: 左双燕)