

家蝇几丁质结合蛋白(*Md-CBP I*)的表达纯化及活性分析

袁野¹, 闫恕¹, 张丹丹¹, 孔令聪¹, 裴志花¹, 刘树明¹, 马红霞^{1,2*}

(1. 吉林农业大学, 动物科学技术学院, 长春 130118; 2. 吉林农业大学, 动物生产及产品质量安全教育部重点实验室, 长春 130118)

[收稿日期] 2015-11-04 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 1-0008-06 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为了研究家蝇几丁质结合蛋白(*Md-CBP I*)在家蝇防御体系中的相关活性,采用PCR技术,对从鸡源沙门氏菌诱导家蝇幼虫构建的抑制性消减文库(SSH)中筛选到的家蝇幼虫几丁质结合蛋白I基因(*Musca domestica* chitin binding protein I, *Md-CBP I*)进行扩增,并成功构建了重组表达质粒 pET-32a-*Md-CBP I*,于大肠杆菌 BL21(DE3)中得以高效表达,纯化并获得了 *Md-CBP I* 融合蛋白。进一步对该蛋白的亲合活性进行了研究,发现 *Md-CBP I* 融合蛋白对几丁质以及纤维素均有一定的结合作用,且其对几丁质的结合作用相对较好。试验为家蝇几丁质结合蛋白生物学活性和免疫学活性的研究奠定了基础。

[关键词] 家蝇;几丁质结合蛋白;克隆;原核表达

Expression, Purification and Activity Analysis of Chitin Binding Protein (*Md-CBP I*) from *Musca domestica*

YUAN Ye¹, YAN Shu¹, ZHANG Dan-dan¹, KONG Ling-cong¹, PEI Zhi-hua¹,
LIU Shu-ming¹, MA Hong-xia^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Animal Production & Product Quality and Security of the Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: In order to research the activities of *Md-CBP I* in *Musca domestica* defence system, *Md-CBP I* was screened from suppression subtractive library (SSH) in *Musca domestica* larvae induced by *Salmonella pullorum* of chickens and also amplified by PCR techniques. The recombinant expression plasmid of pET-32a-*Md-CBP I* was constructed successfully and expressed in *E. Coli* BL21(DE3). fusion protein was obtained by purification, further more, the preliminary study was made on the affinity of which revealed that the fusion protein has binding affinity of both chitin and cellulose, and the affinity of chitin was stronger than cellulose. This research laid a foundation for further research on biological activity and immunological activity of *Md-CBP I*.

Key words: *Musca domestica*; chitin binding protein; clone; prokaryotic expression

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31572574,31502121); 吉林省世行贷款农产品质量安全项目(2011-Y05)

作者简介: 袁野, 硕士研究生, 从事动物药理和毒理学研究。

通讯作者: 马红霞。E-mail: hongxia0731001@163.com

家蝇长期处于病原菌共生的环境中,但却不易被其所感染,根源在于其体内所产生的多种抗菌物质^[1],几丁质就是其产生的众多抗菌物质中的一种。在昆虫体内几丁质与几丁质结合蛋白结合成为一种特殊的复合体:几丁质蛋白复合体,从而对外界损伤、摄入毒素以及病原体感染起着重要的防御作用^[2-3],该复合体也是昆虫体壁重要的组成部分,二者的缺失将会导致表皮功能异常甚至丧失,并且对昆虫的生长、体态协调、变态发育、繁殖能力有很大的影响。此外,一部分几丁质结合蛋白还具有抗细菌、抗真菌和抗病毒活性^[4]。由此可见,几丁质结合蛋白在家蝇防御体系中起着不可或缺的作用,但该蛋白的相关活性还有待深入研究。

为此,本研究以鸡源沙门氏菌诱导家蝇三日龄幼虫抑制性消减文库中筛选出来的差异基因为基础,对家蝇几丁质结合蛋白 I 基因进行克隆及原核表达,并对其亲和活性进行了检测,为该蛋白的深入研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 文库、菌种及表达载体 鸡源沙门氏菌诱导家蝇三日龄幼虫 SSH 文库及 5'RACE-Ready cDNA 由吉林农业大学兽医药理与毒理学实验室完成^[5],大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3)以及原核表达载体 pET-32a(+)由吉林农业大学兽医药理与毒理学实验室保存。

1.1.2 主要试剂及工具酶 Ex Taq 酶, dNTP, 限制性内切酶(*EcoRI*、*XhoI*), T4 DNA 连接酶, DNA Marker(DL2000, λ -*Hind* III digest), pMD18-T Vector, 宝生物工程(大连)有限公司;异丙硫代 β -D半乳糖苷(IPTG), 氨苄青霉素(AMP), 北京鼎国有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司;其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 引物合成和 DNA 测序 引物的合成和重组质粒 DNA 测序由博仕生物工程股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 *Md-CBP I* 的筛选及全长基因的克隆 从本实验室构建的鸡源沙门氏菌诱导家蝇三日龄幼

虫 SSH 文库中筛选获得家蝇差异表达序列 *Md-CBP I*, 该序列与 GenBank 中登陆号为 LOC105262293 的序列相似度为 98%。根据 *Md-CBP I* ORF 序列剪掉信号肽,并用 Primer5.0 软件设计全长 PCR 引物(表 1)。

表 1 *Md-CBP I* 基因的全长引物设计

<i>Md-CBP I</i> 基因	
P1	5'-CGG <u>GAATTC</u> CATGGATGATCATGACC-3'
P2	5'-CG <u>CTCGAG</u> CTATTGGTGAATTTTG-3'

以家蝇三日龄幼虫 5'-RACE-Ready cDNA 为模板进行 PCR 扩增,将 PCR 产物纯化后连接至 pMD18-T Vector(命名为 pMD18-T-*Md-CBP I*)并转入大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中,随机挑取单克隆菌落,提取质粒并双酶切鉴定,将阳性克隆的菌液送至博仕生物工程股份有限公司进行测序。

1.2.2 生物信息学分析方法 采用 ExPASy 的在线软件 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测 *Md-CBP I* 编码蛋白的理化性质,对其序列进行分析;采用 MEGA 软件进行多重序列比对分析,并使用临位法构建了系统进化树;运用 EMBL 工具 Pfam(<http://pfam.xfam.org/search/>)对该基因的保守区完整性进行鉴定;根据 cuticleDB 数据库的 Hidden Markov Modeling 软件(<http://bioinformatics2.biol.uoa.gr/cuticleDB/index.jsp>),预测了 *Md-CBP I* 所属的表皮蛋白家族;通过 Prosite 软件(<http://prosite.expasy.org/>),预测了 *Md-CBP I* 基因所含有的磷酸化及糖基化等功能性位点;利用 PSIPRED 软件(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>),对本基因的二级结构进行了预测并分析。

1.2.3 重组表达质粒的表达与纯化 将测序验证后的阳性克隆子和原核表达载体 pET-32a(+)经限制内切酶双酶切回收后,用 T4 DNA 连接酶进行连接。将连接产物转入大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中,随机挑取单克隆菌落提取质粒进行 PCR 及双酶切鉴定,将阳性克隆菌液进行测序验证。将测序正确的重组表达质粒 pET-32a-*Md-CBP I* 转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中,挑取阳性克隆的单克隆菌落至 LB(Amp)培养液中,1% IPTG 诱导表达,诱导 4 h 时收集菌体超声破碎,分别取上清和沉淀进行分析,处理后的产物经蛋白电泳 SDS-PAGE(15%)进行分析。

将以上步骤处理后的上清液加入到经过 Wash Buffer(50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, PH 8.0)平衡过后的镍离子亲和层析柱中,冰上结合 2 h 后收集流出液。分别用 20 mL Wash Buffer 平衡,200 mL Elution Buffer(10 mM - 200 mM Imidazole, 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, PH 8.0)梯度洗脱,收集洗脱液。分别将 20 μL 流出液以及各个梯度的洗脱液处理后经蛋白电泳 SDS - PAGE(15%)进行分析。

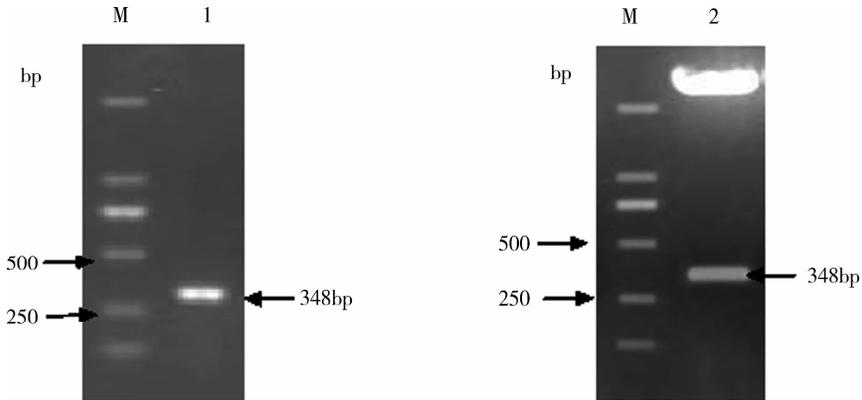
1.2.4 pET - 32a - *Md - CBP I* 融合蛋白的亲性质分析 各取 2 mL 几丁质珠和 2 mL 纤维素(经结合缓冲液处理过夜)入层析柱,将使用结合缓冲液处理后的蛋白以 3 倍体积加入到以上层析柱(室温孵育 3 h)并收集流出液。分别用洗涤缓冲液洗涤 5 次,每次孵育 15 min,收集每次的流出液,最后用 8 M 尿素洗脱,收集洗脱液。分别将 20 μL 流出液

以及洗脱液处理后经蛋白电泳 SDS - PAGE(15%)进行分析^[6-7]。

1.2.5 生物活性检测 利用牛津杯法,分别检测纯化后的融合蛋白对大肠杆菌,金黄色葡萄球菌,沙门氏菌的生物活性。取 100 μL 菌液(10^5 CFU/mL)均匀涂布于琼脂平板上,放入牛津杯,杯内加入纯化后的融合蛋白(4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$),37 $^\circ\text{C}$ 过夜培养,观察抑菌圈大小。

2 结果与分析

2.1 *Md - CBP I* 全长基因的扩增及克隆 *Md - CBP I* 经 PCR 扩增后获得 348 bp 大小的条带。将纯化产物与 pMD18 - T 载体连接,限制性内切酶双酶切验证和测序验证均为阳性,证明 pMD18 - T - *Md - CBP I* 构建成功。*Md - CBP I* 全长 ORF 基因 PCR 扩增和 pMD18 - T - *Md - CBP I* 双酶切鉴定(图 1)。



M: DNA 分子量标准 DL2000;1: 重组质粒 *Md - CBP I* 的全长 PCR 产物;

2: 重组质粒 pMD18 - T - *Md - CBP I* 的 *EcoR I* 和 *Xho I* 双酶切

图 1 *Md - CBP I* 全长 ORF 基因 PCR 扩增和 pMD18 - T - *Md - CBP I* 双酶切鉴定

2.2 生物信息学分析

2.2.1 序列分析 全长序列分析显示该基因全长为 570 bp, ORF 为 393 bp, 剪掉信号肽后为 348 bp, 共编码 114 个氨基酸。预测后的等电点为 5.63, 预测分子量约为 14.1 kD。带正电残基(Arg + Lys)为 8, 带负电残基(Asp + Glu)为 33。该蛋白的不稳定系数为 9.19, 说明该蛋白很稳定。脂肪指数为 37.54, 亲水性系数为 -2.031, 说明该蛋白为亲水性蛋白。

2.2.2 基因的同源性及系统进化树构建 系统进化树分析表明 *Md - CBP I* 与家蝇其它表皮蛋白和厩螫蝇表皮蛋白亲缘关系较远(图 2)。

2.2.3 编码蛋白结构域预测 通过保守区鉴定后,结果显示,*Md - CBP I* 编码的蛋白质在 57 - 108 位氨基酸处含有 Chitin - Bind 4 保守基序,该保守基序作为几丁质结合位点的 R - R 保守区域的扩展版本,为此,可以确定该家族为昆虫表皮蛋白,属于 CPR 家族(图 3)。

相关软件预测显示 *Md - CBP I* 编码的蛋白质属于表皮蛋白 RR - 1 亚族。该亚族存在于柔软表皮层中,与预测中幼虫表皮蛋白基因相符。

Prosit 分析表明,该基因在 102 - 105 位氨基酸处含有磷酸化位点。可能与 *Md - CBP I* 编码的蛋白质的功能密切相关。

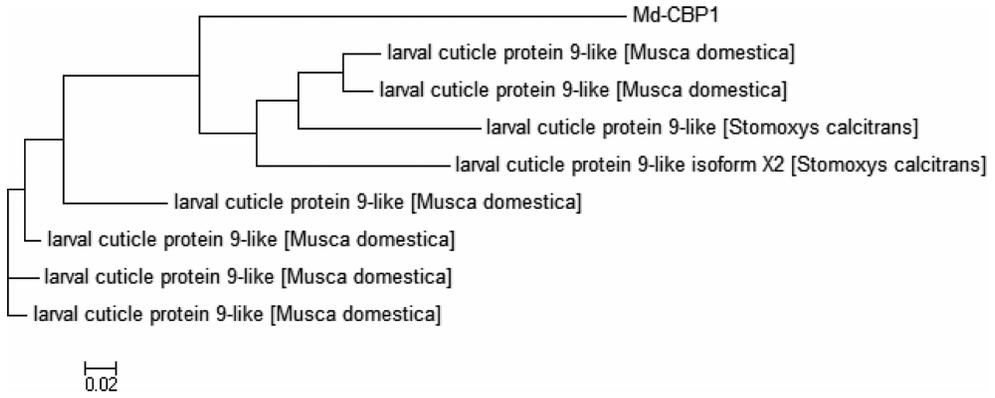


图2 *Md-CBP I* 与蝇类其它表皮蛋白的系统进化分析

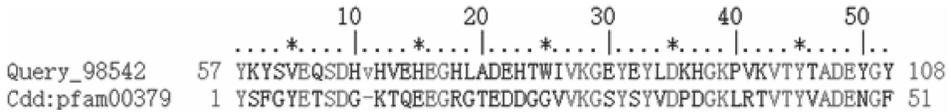


图3 Pfam 对 *Md-CBP I* 的保守区分析

2.2.4 编码蛋白二级结构分析 β -折叠是表皮蛋白-几丁质相互作用所必需的基本结构^[12],二

级结构预测结果显示,在几丁质结合区域中 β -折叠的比率高达 60.7%,无 α -螺旋结构(图 4)。

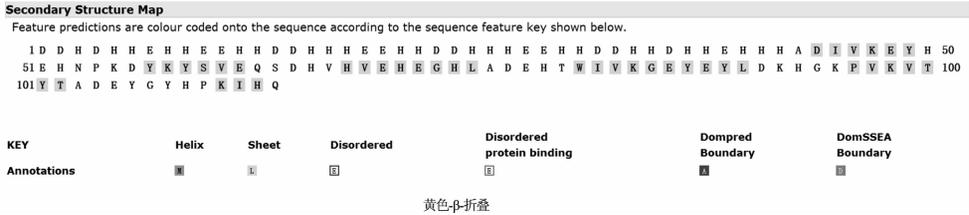
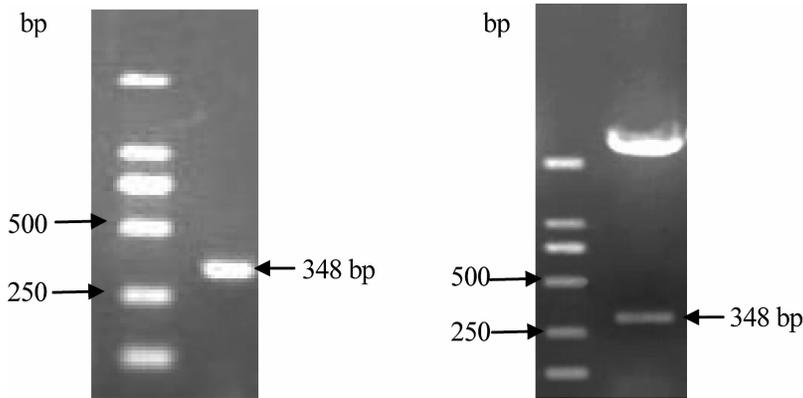


图4 *Md-CBP I* 的二级结构预测

2.3 重组表达质粒的表达与纯化 将重组表达质粒通过 PCR 及限制性内切酶双酶切验证,在约 348 bp 处有一条清晰的条带,与目的基因大小相符

(图 5)。通过测序验证,成功构建了重组表达质粒 pET-32a-Md-CBP I。

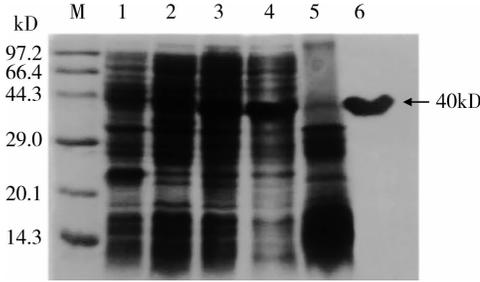


M: DNA 分子量标准 DL2000;

1: 重组质粒 pET-32a-Md-CBP I 的 PCR 鉴定; 2: pET-32a-Md-CBP I 双酶切

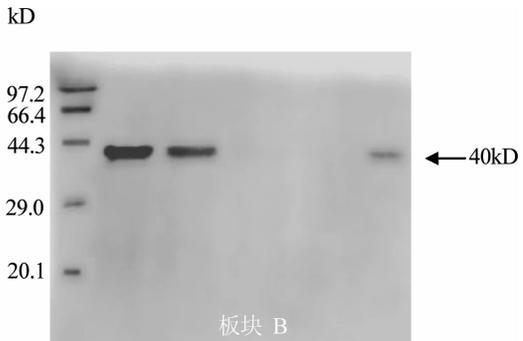
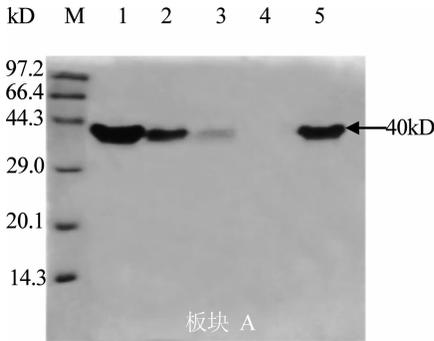
图5 重组质粒 pET-32a-Md-CBP I 的 PCR 及双酶切鉴定

取重组菌诱导前后的表达产物以及破碎后的上清和沉淀进行 SDS - PAGE 电泳,结果显示,诱导的重组菌约在 40 kD 左右出现表达带,而未诱导菌无此条带(图6),说明融合蛋白成功获得表达;对



M:低分子量蛋白 Marker;1:*E. coli* BL21/pET-32a 诱导后; 2:*E. coli* BL21/pET-32a - *Md* - *CBP I* 诱导后; 3:*E. coli* BL21/pET-32a - *Md* - *CBP I* 诱导 4 h 后;4-5: pET-32a - *Md* - *CBP I* 超声破碎后上清及沉淀; 6:纯化后的融合蛋白

图6 重组质粒 pET-32a - *Md* - *CBP I* 表达产物及融合蛋白纯化的 SDS - PAGE 分析



板块 A:几丁质; 板块 B:纤维素;M:低分子量蛋白 Marker; 1. 融合蛋白; 2. 流出液; 3. 第一次洗涤组分; 4. 最后一次洗涤组分; 5. 洗脱液溶出的融合蛋白

图7 pET-32a - *Md* - *CBP I* 融合蛋白亲和性质分析结果

由于原核表达的融合蛋白结合能力较弱,所以将洗脱液的组分浓缩。泳道 5 为浓缩 20 倍后的结果。

2.5 生物活性检测 经检测纯化后的融合蛋白对大肠杆菌,金黄色葡萄球菌,沙门氏菌均无抑菌活性。

3 讨论

几丁质是家蝇众多抗菌物质中的一类,家蝇体内含有大量高纯度的几丁质,而幼虫表皮和蛹壳是提取几丁质的主要原料,其中蛆壳中的几丁质含量达 95% 以上^[8-9]。近年来,国内外学者已对家蝇几丁质的作用有了一定的了解,但对其编码基因以及防御、免疫等方面的研究才刚刚起步。本研究以鸡

其可溶性行分析,结果显示融合蛋白主要在上清中表达,属于可溶性表达;对融合蛋白进行纯化,并将纯化后的蛋白经过蛋白电泳 SDS - PAGE 检测,在约 40 kD 大小处得到单一条带,表明获得较高纯度的融合蛋白(图6)。

2.4 亲和性质分析 将流出液以及洗脱液通过蛋白电泳 SDS - PAGE 分析后显示,与几丁质和纤维素结合的蛋白大小在 40 kD 左右,与目的蛋白大小一致(图7)(为保证体外亲和试验的特异性,结合缓冲液含有较高的盐离子浓度,并通过洗涤缓冲液反复洗涤,除去非特异性结合的蛋白^[11])。在上样量保持相同的条件下,几丁质亲和实验中洗脱液的浓度相对较高,结果显示,纯化后的融合蛋白均可以与几丁质以及纤维素特异性结合,且融合蛋白对几丁质的结合能力要比纤维素高。

源沙门氏菌诱导家蝇三日龄幼虫抑制性消减文库中筛选出来的差异基因为基础,对家蝇几丁质结合蛋白 I 基因进行克隆及原核表达,并对表达产物进行亲和性质分析。

根据序列分析显示,*Md* - *CBP I* 属于 CPR 家族,该家族是因含有 R&R 保守区而命名的,是节肢动物中最大的表皮蛋白家族。目前,该家族中的几种昆虫已经成功获得全基因组序列,其中对果蝇、冈比亚按蚊、西方蜜蜂、家蚕、金小蜂和赤拟谷盗的表皮蛋白基因已经进行了详细的人工标注^[10]。

本文首次报道了含有 R&R 保守序列的扩展版本 *chitin_bind_4* 的家蝇几丁质结合蛋白。通过信号肽预测软件,发现 *Md* - *CBP I* 基因含有一个包

含 17 个氨基酸残基的信号肽序列,其为表皮蛋白的常见特征。*Md - CBP I* 基因属于表皮蛋白的 RR - 2 亚家族,该家族对昆虫表皮的硬化起着关键的作用,且其编码的氨基酸序列中,含有大量的组氨酸和赖氨酸,相关研究证明,这两种氨基酸在硬化反应中也具有一定意义^[11-12]。通过对构建的进化树我们发现,*Md - CBP I* 与家蝇其它表皮蛋白和厩螫蝇表皮蛋白亲缘关系较远。但其功能是否与其他表皮蛋白有差异,还有待于进一步研究。

此外,试验进一步对该蛋白的亲合活性进行了研究,发现其对几丁质以及纤维素都有一定的结合作用,显示了该蛋白对多糖底物的结合能力。相关文献显示,几丁质结合蛋白结合多糖底物的能力可能赋予了该蛋白抗菌、抗真菌以及抗病毒活性^[13-14]。试验采用的是大肠杆菌原核表达系统,大肠杆菌的胞质环境是高度还原的,所产生的蛋白并不包含稳定的二硫键,而二硫键是几丁质结合蛋白的一个重要特征,这可能是 *Md - CBP I* 融合蛋白无抑菌活性的原因。而 *Md - CBP I* 是否含有抗真菌以及抗病毒活性,或在真核表达系统中是否含有相应的活性还有待进一步研究。这也验证了筛选自鸡沙门氏菌诱导后构建的 SSH 文库中的 *Md - CBP I* 基因,其在诱导后表达量的增加可能对家蝇对沙门氏菌的耐受起着重要的作用。

参考文献:

- [1] 左红梅. 大肠杆菌诱导家蝇幼虫抑制性消减文库构建及部分差异基因分析[D]. 长春:吉林农业大学,2011.
- [2] Kuraishi T, Hori A, Kurata S. Host - microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster* [J]. *Frontiers in Physiology*, 2013, 4: 375 - 375.
- [3] Shirk P D, Perera O P, Shelby K S, *et al.* Unique synteny and alternate splicing of the chitin synthases in closely related Heliothine moths [J]. *Gene*, 2015; 19.
- [4] Destoumieux D, Mu M, Cosseau C, *et al.* Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin - binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge [J]. *Journal of Cell Science*, 2000, 113 (3):461 - 469.
- [5] 王东方,张惠,马红霞,等. 猪肺炎支原体诱导家蝇幼虫抑制性消减文库的构建[J]. *中国兽医学报*, 2013, 33 (3): 358 - 361.
- [6] Rebers J E, Willis J H. A conserved domain in arthropod cuticular proteins binds chitin [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 31 (11): 1083 - 1093.
- [7] 唐亮. 家蚕表皮几丁质结合蛋白的纯化与鉴定[D]. 重庆:西南大学,2010.
- [8] 王璐,王效杰. 家蝇几丁质的研究进展[J]. *沈阳医学院学报*, 2013, 15(1): 58 - 60.
- [9] Tetreau G, Cao X, Chen Y R, *et al.* Overview of chitin metabolism enzymes in *Manduca sexta*; Identification, domain organization, phylogenetic analysis and gene expression [J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2015, 31: 114 - 126.
- [10] 孙汝江. 中华蜜蜂表皮蛋白基因的克隆与功能分析[D]. 山东:山东农业大学,2014.
- [11] Kramer K J, Kanost M R, Hopkins T L, *et al.* Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems [J]. *Tetrahedron*, 2001, 57(2): 385 - 392.
- [12] Kerwin J L, Turecek F, Xu R, *et al.* Mass spectrometric analysis of catechol - histidine adducts from insect cuticle [J]. *Analytical Biochemistry*, 1999, 268(2): 229 - 237.
- [13] Kawabata S, Nagayama R, Hirata M, *et al.* Tachycitin, a small granular component in horseshoe crab hemocytes, is an antimicrobial protein with chitin - binding activity [J]. *J Bio Chem*, 1996, 20(6): 1253 - 1260.
- [14] Huang X, Xie W, Gong Z. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo Biloba* [J]. *FEBS Lett*, 2000, 478(1/2): 123 - 126.
- [15] Chen K Y, Hsu T C, Huang P Y, *et al.* *Penaeus monodon* chitin - binding protein (PmCBP) is involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(3): 460 - 465.
- [16] Vaaje - Kolstad G, Horn S J, Aalten D M F V, *et al.* The non - catalytic chitin - binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *J Biol Chem* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280 - 280.
- [17] Petutschnig E K, Jones A M E, Liliya S, *et al.* The lysin motif receptor - like kinase (LysM - RLK) CERK1 is a major chitin - binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin - induced phosphorylation. [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(37):28902 - 28911.

(编辑:陈希)