

高宝德, 张晓丽, 刘海燕, 等. 盘羊杂交羊 SPLUNC1 融合蛋白的真核表达[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(14): 130-133.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.14.036

盘羊杂交羊 SPLUNC1 融合蛋白的真核表达

高宝德¹, 张晓丽², 刘海燕², 张彦兵¹, 孙延鸣²

(1. 石河子大学生命科学学院, 新疆石河子 832003; 2. 石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832003)

摘要:为构建盘羊杂交羊 *SPLUNC1* 基因的真核表达载体并在巴斯德毕赤酵母中表达, 从盘羊杂交羊口腔上颌的上皮细胞中提取总 RNA, 并反转录成 cDNA, 以该 cDNA 为模板采用逆转录 PCR (RT-PCR) 法克隆盘羊杂交羊 *SPLUNC1* 基因开放阅读框, 并克隆到 pPIC9K 载体中, 构建真核表达载体 pPIC9K-SPLUNC1, 再将重组质粒电转至毕赤酵母 GS115 中进行表达, 表达产物经 Ni-NTA 琼脂亲和层析纯化, 并利用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和蛋白质印迹 (Western Blot) 方法检测。结果显示, 目的基因大小 758 bp, 重组表达质粒 pPIC9K-SPLUNC1 经双酶切、PCR 及测序鉴定构建成功; 表达产物经 SDS-PAGE 分析, 可见大小为 25.96 ku 的目的条带, 且在 72 h 表达量最大; 纯化后经 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析, 可见大小为 25.96 ku 的目的条带。研究结果表明, 利用真核表达系统在体外成功表达并纯化了盘羊杂交羊 rSPLUNC1 蛋白, 为深入研究盘羊杂交羊 SPLUNC1 蛋白的生物学功能奠定基础。

关键词: 盘羊杂交羊; 短颚、肺及鼻咽上皮细胞克隆 1; 融合蛋白; 真核表达

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)14-0130-04

气道上皮细胞构成宿主防御的第一道防线, 上皮细胞分泌物有助于防止病原体侵害, 协调免疫反应, 并限制肺损伤。呼吸道分泌物含有大量蛋白质, 这些蛋白很多是由上皮细胞分泌的, 并在黏膜纤毛的清除、抗菌防御和免疫调节中有很重要的作用。其中短颚、肺及鼻咽上皮细胞克隆 1 (short palate, lung and nasal epithelium clone 1, 简称 SPLUNC1) 基因就高效表达于口腔、鼻腔、鼻咽部及呼吸道黏膜^[1]。

很多研究表明 SPLUNC1 是呼吸道黏膜分泌的具有抗菌活性的重要蛋白, 体外的研究表明, 重组人 SPLUNC1 被证实具有杀灭流感嗜血杆菌的抗菌活性^[2]。Zhou 等研究证明, 使用不同浓度重组人 SPLUNC1 蛋白, 可以减少铜绿假单胞菌的生长且具有剂量依赖性^[3]。许多研究证实 SPLUNC1 在体内也具有较强的抗菌活性。Di 研究证实, 在被铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌感染时, 过表达人 *SPLUNC1* 的转基因小鼠比野生型小鼠抗菌活性明显增强^[4]。此外, 过表达人 *SPLUNC1* 的转基因小鼠与同窝出生的野生型小鼠相比对肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*, 简称 Mp) 感染的抵抗力显著增强^[5]。据报道, 重组小鼠 SPLUNC1 蛋白可显著抑制 Mp 的生长且具有剂量依赖性^[6]。研究还表明, SPLUNC1 具有结合革兰氏阴性菌脂多糖的能力^[7-8]。相关研究显示, 用逆转录 PCR

(RT-PCR) 法检测鼻咽癌活检组织的 *SPLUNC1* mRNA 表达水平, 发现其比正常组织的表达量明显下降, 推测 *SPLUNC1* 可能是鼻咽癌的抑癌基因^[9]。但目前对 *SPLUNC1* 功能的研究主要集中在人和鼠, 还未见羊的有关该基因功能的相关报道。因此, 本试验通过构建盘羊杂交羊 *SPLUNC1* 基因真核表达载体, 利用巴斯德毕赤酵母对 *SPLUNC1* 基因进行表达, 使用 Western Blot 对目的蛋白检测, 为研究盘羊杂交羊 SPLUNC1 蛋白的生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 大肠杆菌 DH5 α 由笔者所在实验室保存; T4 DNA 连接酶 (天根生化科技有限公司); 反转录试剂盒、*Sna*B I、*Not* I、*Sac* I 和 *Taq* 聚合酶, 均购自 TaKaRa 公司; 酵母氮碱 (YNB)、G418、生物素, 均购自索莱宝科技有限公司; 蛋白 Marker (Thermo); 酵母基因组 DNA 快速提取试剂盒、质粒小量提取制备试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DNA Marker DL2501 和 DNA Marker DL2503, 购自上海捷瑞生物工程有限公司; Ni-NTA 琼脂 (QIAGEN 公司); 封闭液、一抗 (Anti-His Antibody), 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 二抗辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (北京诺博莱德科技有限公司); 蛋白预染 Marker (北京全式金生物技术有限公司); GS115 菌株及 pPIC9K 由新疆农垦科学院兽医研究所薄新文研究员馈赠。

1.1.2 试验动物 盘羊杂交羊 F₁ 5 只, 由石河子绿洲动物园提供。

响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2011.

[18] 范石军, 韩友文, 李德发, 等. 雏鸡高温应激与超氧化处理对其肝脏丙二醛和谷胱甘肽过氧化物酶含量及活性的影响[J]. 中国饲料, 2001(10): 11-13.

收稿日期: 2016-03-21

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31460686)。

作者简介: 高宝德 (1988—), 男, 甘肃白银人, 硕士, 研究方向为动物学。E-mail: 1369820915@qq.com。

通信作者: 孙延鸣, 博士, 教授, 主要研究方向为临床兽医学。

E-mail: sym@shzu.edu.cn。

based on selenium-regulated selenoprotein mRNA levels are uniformly less than those based on glutathione peroxidase activity [J]. Journal of Nutrition, 2009, 139(2): 199-206.

[17] 倪丽丽. 有机硒对奶牛瘤胃发酵, 抗氧化功能及免疫功能的影响

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据笔者所在实验室已克隆的盘羊杂交羊 *SPLUNC1* 基因 cDNA 全长序列,使用 Primer5 软件设计 1 对特异性引物,并引入 $6 \times \text{His}$ 标签以及 *SnaB* I、*Not* I 酶切位点。上游引物 SPL1:5'-TACGTAATGCACCACCACCACCACCACCTGCTAGAAGCCCTGCCCG-3',下游引物 SPL2:5'-GCGGCGCTCAGACTTTGATGACAAATCTAGCCC-3'。引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

1.2.2 总 RNA 的提取及目的片段的扩增 用高压灭菌的药匙刮取盘羊杂交羊口腔上颚上皮细胞,置于 1.5 mL 离心管中,迅速加入 1 mL TRIzol 提取总 RNA。用微量紫外检测仪对 RNA 进行浓度测定,用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。选用电泳条带完整清晰且 $D_{260 \text{ nm}}/D_{280 \text{ nm}}$ 值为 1.9~2.0 的 RNA 进行 cDNA 的合成。

用反转录试剂盒,以提取的总 RNA 为模板进行 cDNA 合成,以该 cDNA 为模板,用引物 SPL1 和 SPL2 进行 PCR 扩增,反应条件:94 °C 5 min;94 °C 45 s,65 °C 35 s,72 °C 60 s,34 个循环;72 °C 10 min,4 °C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,目的片段回收后,-20 °C 保存备用。

1.2.3 重组表达质粒 pPIC9K-SPLUNC1 的获得 用 *SnaB* I 和 *Not* I 分别对盘羊杂交羊 *SPLUNC1* 基因扩增产物及 pPIC9K 载体进行双酶切,用 T_4 DNA 连接酶连接。用 10 μL 连接产物转化 100 μL 感受态细胞 DH5 α ,16 °C 过夜。转化后涂布于含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 琼脂板,37 °C 过夜。挑取 5 个单菌落,接种于 10 mL 含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 °C、170 r/min 振荡过夜。取 1 mL 菌液,提取质粒,进行 PCR 鉴定和双酶切鉴定,同时将 1 mL 菌液送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。测序正确的重组质粒命名为 pPIC9K-SPLUNC1。

1.2.4 重组表达质粒 pPIC9K-SPLUNC1 的转化与重组菌株鉴定 取 80 μL 感受态酵母菌 GS115 与 20 μL *Sac* I 线性化的重组表达质粒 pPIC9K-SPLUNC1 混合,电击转化后涂布于 MD 平板,28 °C 孵育约 3 d,直至出现单菌落。

挑取 5 个单菌落,用酵母基因组快速提取试剂盒提取酵母基因组 DNA,以其为模板,分别用特异性表达引物和载体上的通用引物(α -Factor:5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'和 3'AOX1:5'-GCAATGGCATTCTGACATCC-3')作基因型和表型鉴定。基因型鉴定的 PCR 反应条件同目的片段的扩增。表型鉴定的反应条件:94 °C 5 min;94 °C 45 s,54 °C 30 s,72 °C 60 s,34 个循环;72 °C 10 min,4 °C 保存。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。将表现型、基因型均鉴定正确的重组毕赤酵母依次接种至 G418 含量分别为 0.25、0.50、1.00、2.00 mg/mL 的 YPD 平板进行抗性筛选高拷贝,阳性菌株命名为 GS115/pPIC9K-SPLUNC1。

1.2.5 重组 GS115/pPIC9K-SPLUNC1 的诱导表达与产物的鉴定 将鉴定正确的重组 GS115/pPIC9K-SPLUNC1 接种于 25 mL YPD 液体培养基中,28 °C 恒温培养至 $D_{600 \text{ nm}}$ 约为 4,8 000 r/min 离心 3 min,收集菌体。将菌体转接于 100 mL BMMY 培养基中继续培养。每 24 h 加入终浓度为 0.5% 的甲醇诱导表达,同时分别于 0、24、48、72 h 取 1 mL 菌液样品,离心收集上清和菌体,并将上清和菌体分别进行聚丙烯酰胺凝胶电

泳(SDS-PAGE)鉴定。

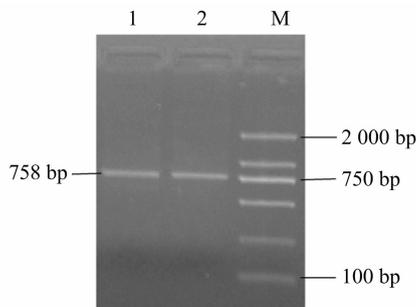
1.2.6 表达产物的纯化及 Western Blot 鉴定 将 SDS-PAGE 结果含目的条带的表达产物用 0.45 μm 的滤膜过滤,滤液经 Ni-NTA 琼脂亲和层析柱,用 10~15 倍体积的结合缓冲液(pH 值为 8.0 的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液,含 0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L 咪唑)进行漂洗,直到吸光度达到稳定值,分管收集流出液体;用洗脱缓冲液(pH 值为 8.0 的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液含 0.5 mol/L NaCl,300 mmol/L 咪唑)进行洗脱,分别收集流出液体并且经 SDS-PAGE 分析。

纯化的蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,将蛋白电转到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,然后将膜置于封闭液中封闭 1 h;一抗 Anti-His 标签的鼠单克隆抗体(按 1:2 000 稀释)4 °C 孵育过夜,过夜后用三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液(TBS)+吐温(T)(TBST)洗 3 次(10 min/次),二抗辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(按 1:5 000 稀释)室温孵育 90 min,然后用 TBST 洗 3 次(10 min/次),最后用二氨基联苯胺(DAB)显色液进行显色。

2 结果与分析

2.1 目的片段的扩增

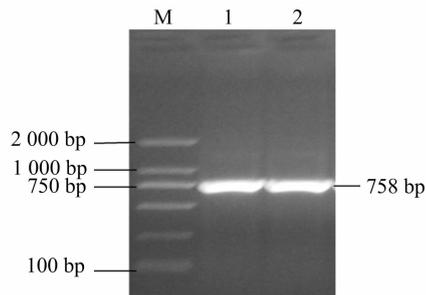
以反转录获得的 cDNA 为模板,用特异性表达引物进行 PCR 扩增,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,出现大小为 758 bp 的条带,与预期片段大小相符合(图 1)。



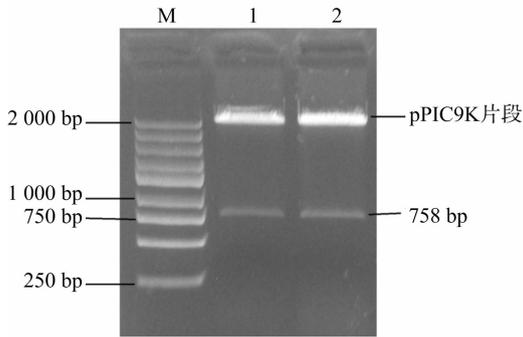
M—DNA marker; 1、2—*SPLUNC1* 基因 PCR 产物
图1 *SPLUNC1* 基因 PCR 扩增产物电泳结果

2.2 重组表达质粒 pPIC9K-SPLUNC1 的鉴定

用特异性表达引物对重组表达质粒 pPIC9K-SPLUNC1 进行 PCR,鉴定出现大小为 758 bp 的 1 条带,与试验设计相符(图 2)。经 *SnaB* I 和 *Not* I 双酶切出现 2 条带,1 条大小约为 10 kb,与载体片段大小相同;另 1 条大小为 758 bp,与外源目的片段大小相同(图 3)。重组表达质粒 pPIC9K-SPLUNC1 的鉴定显示,目的基因已克隆到 pPIC9K 载体中。



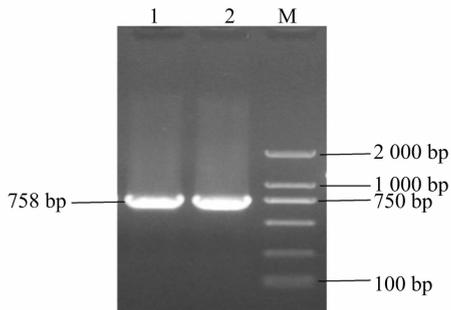
M—DNA marker; 1、2—重组质粒 pPIC9K-SPLUNC1 PCR 产物
图2 重组质粒 pPIC9K-SPLUNC1 PCR 鉴定结果



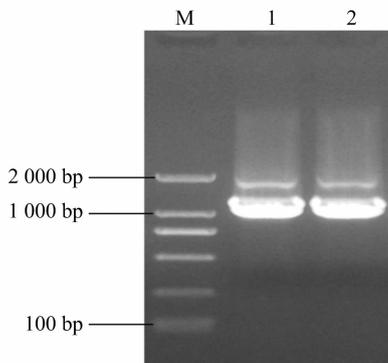
M—DNA marker; 1、2—重组质粒双酶切产物
图3 重组质粒 pPIC9K-SPLUNC1 双酶切鉴定结果

2.3 重组菌株 GS115/pPIC9K-SPLUNC1 的 PCR 鉴定

以提取的重组酵母菌的基因组为模板,用特异性表达引物进行 PCR,出现大小为 758 bp 的 1 条带(图 4)。用载体上的通用引物进行 PCR 扩增,出现 2 条带(图 5)。重组表达系统的 PCR 鉴定结果表明,重组表达酵母菌株 GS115/pPIC9K-SPLUNC1 转化成功。



M—DNA marker; 1、2—阳性克隆表达引物 PCR 产物
图4 重组菌株 GS115/pPIC9K-SPLUNC1 的基因型鉴定结果



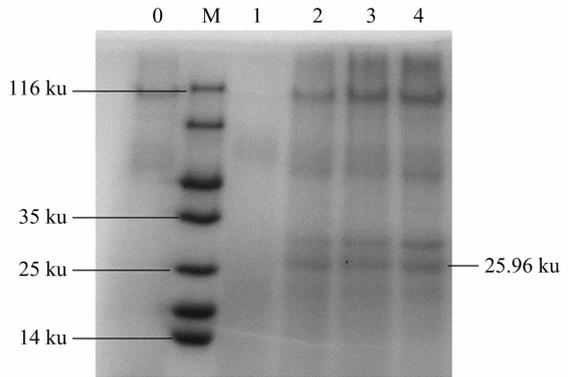
M—DNA marker; 1、2—阳性克隆载体通用引物 PCR 产物
图5 重组菌株 GS115/pPIC9K-SPLUNC1 的表现型鉴定结果

2.4 SPLUNC1 融合蛋白的鉴定

重组菌株 GS115/pPIC9K-SPLUNC1 经甲醇诱导表达后,培养上清经 SDS-PAGE 检测,在 25.96 ku 出现 1 条目的条带,与预测的目的蛋白大小相符,而在空载体表达产物和 0 h 未见有相同条带(图 6),这表明重组 SPLUNC1 蛋白已表达成功。菌体经 SDS-PAGE 分析无预测的目的蛋白条带。

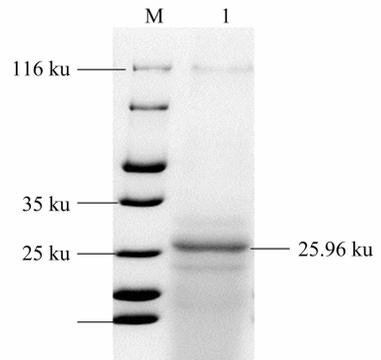
2.5 SPLUNC1 融合蛋白的纯化与鉴定

表达的蛋白经 Ni-NTA 琼脂亲和层析纯化后,SDS-PAGE 结果得到单一的大小为 25.96 ku 的融合蛋白目的条带

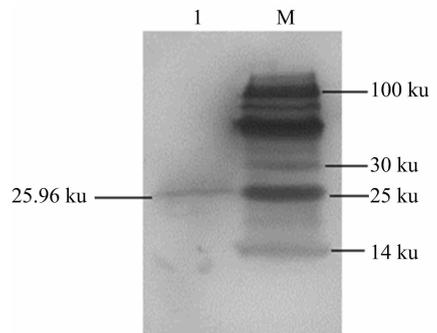


M—蛋白 marker; 0—GS115/pPIC9K 空载体表达产物; 1—4—GS115/pPIC9K-SPLUNC1 在 0、24、48、72 h 表达产物
图6 SPLUNC1 融合蛋白的 SDS-PAGE 检测结果

(图 7),纯化后的融合蛋白经 Western Blot 分析,结果在 25.96 ku 处出现 1 条明显的蛋白条带(图 8),由此说明已在酵母中成功表达 SPLUNC1 融合蛋白并纯化成功。



M—蛋白 marker; 1—纯化样品
图7 SPLUNC1 融合蛋白纯化产物的 SDS-PAGE 检测结果



M—蛋白预染 marker; 1—SPLUNC1 蛋白样品
图8 SPLUNC1 蛋白的 Western blot 检测结果

3 讨论

本试验以盘羊杂交羊为研究对象,通过 RT-PCR 法扩增其 SPLUNC1 开放阅读框,克隆到 pPIC9K 载体上,并电转至 GS115 中用甲醇诱导表达,使用 Ni-NTA 琼脂亲和层析纯化,SDS-PAGE 检测结果显示成功获得重组表达菌株 GS115/pPIC9K-SPLUNC1 和 SPLUNC1 融合蛋白。

近年来,通过将目的基因克隆到表达载体中,并将重组质粒导入真核表达系统中使其高效表达,是研究该基因功能及

获得重组蛋白的有效方法^[10]。本试验采用巴斯德毕赤酵母作为真核表达菌株。巴斯德毕赤酵母表达系统是外源蛋白表达过程中被广泛使用的真核表达系统,也是目前外源蛋白表达系统中最方便、最有效的表达系统之一^[11]。外源蛋白在巴斯德毕赤酵母中高效表达,有利于表达后蛋白纯化、降低生产成本,在生产中具有重要意义^[12]。巴斯德毕赤酵母能利用甲醇作为碳源,因为甲醇能够诱导醇氧化酶(AOX)基因表达,产生AOX1,从而使其含量为总细胞蛋白含量的30%~40%^[13]。本试验的宿主菌为GS115菌株,该菌株具有完整的编码AOX1基因,在含甲醇的培养基中能够迅速生长,所以表型为Mut+(甲醇利用快速型),同时可以使外源蛋白得到高效表达。本试验结果显示,SPLUNC1融合蛋白在72h表达量最大。

本研究所用的载体为pPIC9K载体,是一种分泌型载体。此载体以组氨酸脱氢酶基因(*His4*)为选择标记,同时含有AOX1基因启动子、终止子和卡那霉素抗性基因标记等。这样的组合方式既有利于外源基因通过该质粒整合到酵母基因组中,也有利于重组酵母的筛选、表达以及外源蛋白的纯化、检测。本试验结果显示,甲醇诱导表达后SPLUNC1融合蛋白存在于重组酵母培养上清液中,而在菌体中无目的蛋白,这表明使用pPIC9K载体可使目的蛋白分泌到培养液中。与固定化金属离子作用最强的氨基酸为组氨酸,多聚组氨酸标签因其在表达过程中对目的蛋白质性质影响较小以及纯化方法简单、方便、成本低等优点在蛋白质亲和纯化中被广泛使用^[14]。因此,本研究在设计引物时加入6×His标签,所表达的蛋白含有His标签,便于后续试验中蛋白纯化和检测。本试验结果显示,所表达的His融合蛋白经Ni-NTA纯化后杂蛋白减少,且能与抗His标签抗体结合。

蛋白免疫印迹(Western Blot)结合了分辨率高的电泳技术以及高特异性和敏感性的酶免疫测定技术,是蛋白分析的一种常规技术,用于检测样品中是否存在特异蛋白^[15]。本研究表达的SPLUNC1融合蛋白含6×His标签,因此本试验使用His标签抗体进行蛋白免疫印迹检测表达产物中是否含有带His标签的SPLUNC1融合蛋白。结果显示,出现1条特异性条带,与预测相符,表明表达产物中存在SPLUNC1融合蛋白。

有资料报道,盘羊(♂)与巴什拜羊(♀)的杂交后代羔羊易感染绵羊肺炎支原体(*Mycoplasma ovipneumoniae*,简称Mo)而引起大量死亡^[16]。SPLUNC1基因是宿主先天性防御肺炎支原体感染的关键基因。本试验利用毕赤酵母成功表达并纯化了盘羊杂交羊SPLUNC1融合蛋白,为进一步研究盘羊杂交羊SPLUNC1基因的生物学功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] 薛君力,周立娟,曾姣娥,等.天然免疫相关蛋白分子SPLUNC1载体构建及蛋白稳定表达[J].细胞与分子免疫学杂志,2015,31(4):500-503.
- [2] Chu H W, Thaikoothathil J, Rino J G, et al. Function and regulation of SPLUNC1 protein in *Mycoplasma* infection and allergic inflammation [J]. *Journal of Immunology*, 2007, 179(6):3995-4002.
- [3] Zhou H D, Li X L, Li G Y, et al. Effect of SPLUNC1 protein on the *Pseudomonas aeruginosa* and Epstein-Barr virus [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2008, 309(1/2):191-197.
- [4] Di Y P. Functional roles of SPLUNC1 in the innate immune response against Gram-negative bacteria [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2011, 39(4):1051-1055.
- [5] Gally F, Di Y P, Smith S K, et al. SPLUNC1 promotes lung innate defense against *Mycoplasma pneumoniae* infection in mice [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2011, 178(5):2159-2167.
- [6] McGillivray G, Bakaletz L O. The multifunctional host defense peptide SPLUNC1 is critical for homeostasis of the mammalian upper airway [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10):e13224.
- [7] Ghafouri B, Kihlström E, Tagesson C, et al. PLUNC in human nasal lavage fluid: multiple isoforms that bind to lipopolysaccharide [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1699(1/2):57-63.
- [8] Sayeed S, Nistico L, St Croix C, et al. Multifunctional role of human SPLUNC1 in *Pseudomonas aeruginosa* infection [J]. *Infection and Immunity*, 2013, 81(1):285-291.
- [9] 薛君力,张洪涛. SPLUNC1在呼吸道疾病中的研究进展[J].国际呼吸杂志,2009,29(21):1329-1332.
- [10] 苏艳芳,付元帅,施志仪,等.牙鲆*SRF*基因的克隆及真核表达载体的构建[J].海洋渔业,2015,37(4):331-338.
- [11] 陆永超.毕赤酵母高效表达策略概述[J].微生物学免疫学进展,2013,41(1):70-76.
- [12] 王冶,郑甲,唐诗哲,等.外源蛋白在巴斯德毕赤酵母中高效分泌表达的前沿技术[J].基因组学与应用生物学,2014,33(3):689-694.
- [13] 闵兆升,郭会明,颜旭,等.巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)高密度发酵研究进展[J].生物技术通报,2014(3):42-49.
- [14] 阮建兵,梅艳珍.多聚组氨酸融合标签在蛋白药物开发中的应用[J].生物技术通报,2012(6):49-53.
- [15] 姜晨晨,程军军,黄梦昊,等.蛋白免疫印迹半定量分析在药理学研究中的影响因素[J].中国药理学杂志,2015,50(9):758-762.
- [16] 郭海英,沈文,陈冬梅,等.杀菌性/通透性增加蛋白对感染绵羊肺炎支原体的盘羊杂交羊的免疫调节作用研究[J].中国预防兽医学报,2015,37(6):481-485.