

GST颗粒溶解素融合蛋白的纯化及其抗菌活性分析

闵宏林^{1,2}, 沈继龙¹, 陈勇³, 李柏青³

[摘要]目的: 纯化大肠埃希菌表达的 GST 颗粒溶解素融合蛋白, 并分析其体外抗菌活性。方法: 将 IPTG 诱导处理后的细菌破碎, 分离含有可溶性 GST 颗粒溶解素融合蛋白的细菌裂解液, 并通过 GSH-琼脂糖珠亲和层析柱纯化。同时采用 MTT 法分析该纯化蛋白的抗菌活性。结果: GST 颗粒溶解素融合蛋白能以可溶性形式在大肠埃希菌中表达, 采用亲和层析法可获得分子量为 44 kDa 的单一蛋白条带。经抗菌活性分析, 表明纯化产物对金黄色葡萄球菌和甲型溶血性链球菌具有显著抑制作用, 而对伤寒沙门菌和大肠埃希菌 BL21 的抗菌活性不明显。结论: 成功纯化 GST 颗粒溶解素融合蛋白, 该蛋白对革兰阳性菌具有高效抗菌活性。

[关键词] 大肠埃希菌; 颗粒溶解素; 融合表达; 纯化; 抗菌作用

[中国图书资料分类法分类号] R 378.24; R 392.11 [文献标识码] A

Purification and antibacterial activity analysis of GST-granulysin fusion protein

MIN Hong lin^{1,2}, SHEN Jilong¹, CHEN Yong³, LI Baiqing³

(1. Department of Microbiology Anhui Medical University, Hefei 230032 2. Department of Microbiology;

3. Department of Immunology Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity, Bengbu Medical College Bengbu 230030 China)

[Abstract] **Objective** To purify GST-granulysin fusion protein expressed in *E. coli* and identify its antibacterial activity *in vitro*. **Methods** *E. coli* was sonicated after it was induced by IPTG, and GST-granulysin fusion protein was separated from the soluble extract. The fusion protein was purified by affinity chromatography with glutathione agarose. Its bactericidal activity was analysed by MTT assay. **Results** Expression of GST-granulysin in *E. coli* was detected by SDS-pAGE methods. After affinity chromatography, a single protein band at about molecular weight 44 kDa was obtained. The result of bactericidal activity analysis indicated that it showed potent antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus sanguis* but it showed weaker antibacterial activity against *Salmonella enterica* and *E. coli* BL21. **Conclusions** The GST-granulysin fusion protein was successfully purified and it exhibits effective bactericidal activity against gram positive bacteria.

[收稿日期] 2006-09-20

[基金项目] 安徽省自然科学基金资助项目(050430603); 安徽省教育厅自然科学基金资助项目(2006kj22zc)

[作者单位] 1. 安徽医科大学病原生物学教研室, 安徽合肥 230032; 蚌埠医学院 2. 病原生物学教研室, 3. 免疫学教研室, 安徽省感染与免疫重点实验室(蚌埠医学院), 安徽蚌埠 233030

[作者简介] 闵宏林(1971-), 女, 讲师。

[Key words] *Escherichia coli*; granulysin; fusion expression; purification; bactericide

颗粒溶解素 (granulysin) 是一种由 74 个氨基酸组成的碱性多肽, 分子量为 15 kDa, 属于脂类结合蛋白皂角素超家族的成员, 可显著表达于激活的人类细胞毒性 T 细胞和自然杀伤细胞内^[1]。大量研

- [2] Gu X, Sharafuddin MJ, Titus JL, *et al*. Acute and delayed outcomes of mechanical thrombectomy with use of the steerable Amplatzer thrombectomy device in a model of subacute inferior vena cava thrombosis [J]. *J Vasc Interv Radiol* 1997; 8(6): 947-956.
- [3] Rilinger N, Gorich J, Scharner-Panler R, *et al*. Short term results with use of the Amplatzer thrombectomy device in the treatment of acute lower limb occlusions [J]. *J Vasc Interv Radiol* 1997; 8(3): 343-348.
- [4] Ufuker R, Rajagopalan PR, Selby JB, *et al*. Treatment of thrombosed dialysis access grafts: Randomized trial of surgical thrombectomy versus mechanical thrombectomy with the Amplatzer device [J]. *J Vasc Interv Radiol* 1996; 7(2): 185-192.
- [5] 段志泉, 张强. 静脉血栓形成 [A]. 见: 段志泉, 张强主编. 实用血管外科学 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1999: 543-544.
- [6] Edwards WS. Femoral av fistula as a complementary or primary procedure for iliac venous occlusion [A]. In: Bergan JJ, Yao JS, *eds*. *Surgery of the veins* [M]. Orlando: Grune, 1985: 267.
- [7] Sawchuk AB, Dalsing MG, Emerick SC, *et al*. A temporary distal arteriovenous fistula improves venous hemodynamics in a model of venous occlusion [J]. *Surgery*, 1987; 102(2): 256-262.
- [8] 曲明, 于永山, 张培华, 等. 动静脉转流重建肢体血液循环的实验和临床研究 [J]. 中华显微外科杂志, 1995; 18(4): 266.
- [9] Terada T, Higashida RT, Halbach VV, *et al*. Development of acquired arteriovenous fistulas in rats due to venous hypertension [J]. *J Neurosurg* 1994; 80(5): 884-889.
- [10] Yamashita K, Taki W, Nakahara J, *et al*. Development of sigmoidal arteriovenous fistulas after transvenous embolization of cavernous dural arteriovenous fistulas [J]. *AJNR Am J Neuroradiol* 1993; 14(5): 1106-1108.
- [11] Muller MM, Griesmacher A. Markers of endothelial dysfunction [J]. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38(2): 77-85.

究资料表明, 颗粒溶解素具有广谱抗菌、抗寄生虫及杀伤肿瘤细胞的生物学作用。Stenger等^[2]报道颗粒溶解素对伤寒沙门菌、绿脓杆菌、单核李斯特菌、白色念珠菌、新型隐球菌以及利什曼原虫具有显著的抑制活性。Emst等^[3]发现 granulysin 蛋白通过直接作用于病原微生物的胞壁或胞膜, 增加其通透性而导致微生物发生渗透性溶解。目前病原微生物对临床抗生素产生日益严重的耐药性, 因此新型抗菌药物的开发已成为一个新的研究热点。本室在前期工作中已完成对 GST-granulysin 融合基因表达载体的构建, 并在大肠埃希菌内成功进行表达^[4]。本文则进一步采用亲和层析法对原核表达的 GST-granulysin 融合蛋白进行纯化, 同时分析其是否具有抗菌活性, 从而为开发新型的抗菌药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 重组质粒 pGEX-4T1-granulysin 由本室自行构建, 大肠埃希菌 BL21 株由中国科技大学免疫学研究所田志刚博士惠赠。金黄色葡萄球菌 Cowan I 株、甲型溶血性链球菌 S₃₄S₁ 株和伤寒沙门菌 0901 株均购于卫生部北京生物制品检定所。GSH-琼脂糖珠亲和层析柱购于 Pharmacia Biotech 公司 (批号: G3907)。异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、还原性谷胱甘肽 (GSH)、溶菌酶、MTT、DNase I 和蛋白质分子量标准均购于华美生物工程公司。其余试剂为国产分析纯。

1.2 GST-granulysin 蛋白的诱导培养 挑取 pGEX-4T1-granulysin 质粒转化的大肠埃希菌 BL21 单菌落种于含有氨苄西林的 LB 培养液内, 于 37℃ 振荡过夜, 然后将其按 1:10 转种, 继续培养至 OD_{600nm} 达到 0.4~0.6 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 诱导表达 7 h 同时在诱导培养第 1、3、5、7 h 时各吸取 1 ml 菌液, 离心收集菌体, 按每克湿菌加入 10 ml 细菌裂解液 [50 mmol/L TrisHCl (pH 8.0), 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 g/L 溶菌酶, 0.2% 脱氧胆酸钠], 于室温搅拌至溶液变黏稠, 补加 1 g/L DNase I 100 μl 和 1 mmol/L MgCl₂ 100 μl 于室温继续搅拌 30 min 经 12000 r/min 离心 20 min 收集上清, 通过 SDS-PAGE 电泳鉴定目的蛋白表达情况。

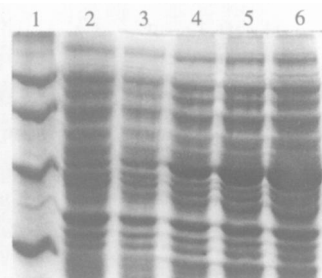
1.3 GST-granulysin 融合蛋白的纯化 参照 Pharmacia Biotech 公司的产品说明书进行。细菌裂解上清液对 PBS 充分透析, 按 1 ml/min 流速通过 GSH-琼脂糖珠亲和层析柱, 再用 PBS 1 ml/min 流速

充分洗涤, 再用洗脱液 [5 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 50 mmol/L TrisHCl (pH 8.0)] 进行洗脱, 分步收集洗脱液, 合并蛋白峰。经 SDS-PAGE 电泳鉴定 GST-granulysin 融合蛋白的纯度。

1.4 GST-granulysin 蛋白的抗菌活性分析 参照文献^[5]的方法进行。将伤寒沙门菌和大肠埃希菌 BL21 接种 LB 培养液, 于 37℃ 振荡培养 12 h。金黄色葡萄球菌和甲型溶血性链球菌涂布于血平板上于 37℃ 培养 24 h 收集的菌体经 PBS 洗涤 3 次, 使菌体充分分散。测定 OD_{600nm} 值, 调整菌液浓度为 1 × 10¹¹ L, 在 96 孔培养板内, 加入细菌菌液 10 μl 于 37℃ 静置 2 h 再加入不同浓度的 GST-granulysin 融合蛋白溶液 10 μl 和 LB 培养液 80 μl 每个浓度组设 3 个复孔, 于 37℃ 孵育 1 h 各孔加入 5 mg/L 的 MTT 溶液 20 μl 37℃ 孵育 20 min 加入 100 μl 二甲亚砜, 室温放置 30 min 后测定 OD_{570nm} 值。并计算 GST-granulysin 融合蛋白的抑菌率。

2 结果

2.1 GST-granulysin 融合蛋白的诱导表达 将 IPTG 诱导不同时间的菌体经裂解液处理, 提取细菌裂解液, 经 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色, 发现空质粒转化菌 BL21 以及经 IPTG 诱导 1 h 的重组质粒转化菌 BL21 内均无目的蛋白表达, 而经诱导 3 h 后, 重组质粒转化菌内出现目的蛋白的显著表达, 在分子量 44 kDa 处出现一条浓染的蛋白条带, 并在诱导 7 h 时其表达量最高。表明 GST-granulysin 融合蛋白可在大肠埃希菌 BL21 中获得高效表达 (见图 1)。

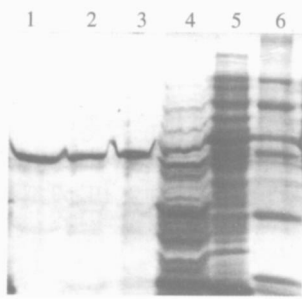


1: 蛋白质分子量标准; 2: 未经诱导的 pGEX-4T1/BL21; 3~6: 分别为 pGEX-4T1-granulysin/BL21 经 IPTG 诱导 1 h、3 h、5 h、7 h

图 1 GST-granulysin 融合蛋白在大肠埃希菌 BL21 中的表达

2.2 GST-granulysin 融合蛋白的亲层析纯化 将 IPTG 诱导后的细菌进行破碎处理, 提取的细菌裂解液上清液直接通过 GSH-琼脂糖珠亲和层析柱纯化, 结果可有效获得纯化的 GST-granulysin 融合蛋白, 经

SDS-PAGE电泳分析,发现在 44 kDa附近呈现单一蛋白条带。这与 GST-granulysin融合蛋白的实际分子量相符(见图 2)。



1-3: 纯化的 GST-granulysin 融合蛋白;4:pGEX-4T1-granulysin/BL21 经 IPTG 诱导后的裂解上清液内杂蛋白;5: 未经诱导的 pGEX-4T1-granulysin/BL21;6: 蛋白质分子量标准

图 2 GST-granulysin 融合蛋白的亲和层析纯化(12% SDS-PAGE)

2.3 GST-granulysin融合蛋白的抗菌活性分析 将纯化的 GST-granulysin融合蛋白经 LB 培养液倍比稀释,分别与不同细菌作用,以分析其体外抗菌活性。结果发现当融合蛋白的浓度为 20 mg/L时,对金黄色葡萄球菌抑菌率达到 75.47%,而对甲型溶血性链球菌的抑菌率可达到 86.75%,表明 granulysin与 GST的融合并不明显影响其对革兰阳性菌的杀伤。当其浓度为 20 mg/L时,对伤寒沙门菌和大肠埃希菌 BL21 的抑菌率则分别仅为 38.63%和 30.91%,表明 GST-granulysin融合蛋白对革兰阴性菌的抗菌作用并不显著(见图 3)。

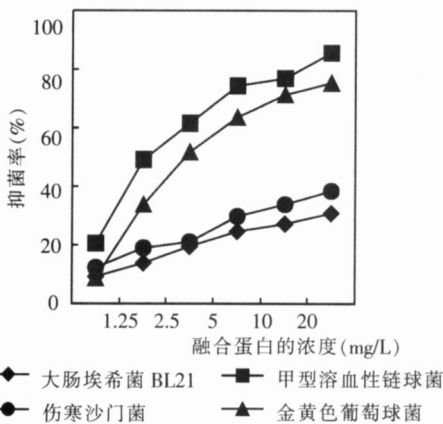


图 3 GST-granulysin 融合蛋白对不同细菌的抑菌率分析

3 讨论

近年来人们在研究机体抗感染免疫防御机制时发现,在人类中性粒细胞、自然杀伤细胞以及 T 细胞中存在多种具有抗菌活性的内源性抗菌肽^[6,7]。这些抗菌肽在正常组织内含量很少,难以进行大规模分离纯化,因此对抗菌肽进行基因重组表达的研

究具有重要的意义。翁宏飏等^[8]报道将具有抗菌活性的死亡肽基因导入 GST融合表达载体,并在大肠埃希菌内高效表达。本室曾将 pGEX-4T1-granulysin质粒转化大肠埃希菌 DH5a内,但其表达量不高。本文则采用 BL21菌株作为宿主菌,同时优化 IPTG 诱导剂的浓度,结果可使其表达量显著升高。兰和魁等^[9]曾将 GST肺表面活性物质融合表达质粒转化 JM109等多种宿主菌,结果发现其表达产物均发生降解,而在 BL21菌株内表达的产物并无降解现象,这对于抗菌肽类的原核表达尤其重要。另外,本文分析了 GST-granulysin融合蛋白的体外抗菌活性,发现该融合蛋白对革兰阴性菌(如宿主菌 BL21)的杀伤活性不高,而对革兰阳性菌仍表现出显著的抗菌活性,可能原因在于 granulysin是通过嵌入病原体胞壁和胞膜而导致细菌死亡,而 GST的存在增加了 granulysin的水溶性,以及改变了 granulysin的表面电荷分布而降低其与脂类的亲和性,因而革兰阴性菌的外层脂质可降低其杀伤活性,但具体机制尚有待进一步的探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Pena SV, Hanson DA, Carr BA, et al Processing subcellular localization and function of 519(granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small lytic granule proteins [J]. *J Immunol* 1997; 158(6): 2 680 - 2 688.
- [2] Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin [J]. *Science* 1998; 282(5 386): 121 - 125.
- [3] Ernst WA, Thoma U, Szyński S, Teitelbaum R, et al Granulysin a T cell product kills bacteria by altering membrane permeability [J]. *J Immunol* 2001; 165(12): 7 102 - 7 108.
- [4] 张海峰,吕合作,李柏青.人颗粒溶解素 cDNA 克隆及在大肠埃希菌中的表达 [J]. 蚌埠医学院学报, 2003; 28(4): 283 - 285.
- [5] 王 栩, 郭于川, 夏世平, 等. MTT 法进行活菌计数的方法学探讨 [J]. 泸州医学院学报, 2002; 25(4): 292 - 293.
- [6] Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, et al Defensins: natural peptide antibiotics of human neutrophils [J]. *J Clin Invest* 1985; 76(4): 1 427 - 1 435.
- [7] Andersson M, Gunne H, Agerberth B, et al NK-lysin: a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2 and antibacterial and antitumor activity [J]. *EMBO J* 1995; 14(8): 1 615 - 1 625.
- [8] 翁宏飏, 牛宝龙, 孟智启, 等. 死亡肽基因的合成及在大肠杆菌中的表达 [J]. 昆虫学报, 2003; 46(1): 114 - 117.
- [9] 兰和魁, 封志纯, 黄建生, 等. 人肺表面活性物质相关蛋白 A1 基因在大肠杆菌中的表达及产物的分离纯化 [J]. 中华儿科杂志, 2001; 39(4): 227 - 230.