

嗜铬粒蛋白 N 区抗真菌活性片段研究^{*}

李瑞芳, 张添元, 罗进贤, 王芳宇, 顾取良, 甘菁菁, 肖 凡
(中山大学生命科学学院 / 基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 为寻找高效低毒的抗真菌药物, 利用 PCR 技术扩增了编码人嗜铬粒蛋白 N 端 18-76、18-66 和 31-76 位氨基酸 (CGA18-76、CGA18-66 和 CGA31-76) 的 DNA 片段, 将之克隆进枯草杆菌诱导型表达载体 pSBPTQ, 获得 3 种重组质粒 pSC18-76、pSC18-66 和 pSC31-76, 转化枯草杆菌 DB1342。SDS-PAGE 分析结果显示: 经蔗糖诱导后, CGA18-76、CGA18-66 和 CGA31-76 片段分别在枯草杆菌工程菌中获得表达, 产物分泌到细胞外。表达量分别为 5.6 mg/L、5.3 mg/L 和 5.6 mg/L。利用孔穴琼脂扩散法检测表达产物的抗真菌活性, 并与 CGA1-76 进行比较, 发现 CGA18-76、CGA18-66 和 CGA31-76 对烟曲霉菌、黄曲霉菌、石膏样小孢子菌和白念珠菌均有抑制作用, 并以 CGA31-76 对白念珠菌的抑制作用为最强, CGA18-66 对除白念珠菌之外的另 3 种测试真菌的抑制作用较强, 而 CGA18-76 对测试真菌的抑制作用最弱。

关键词: 嗜铬粒蛋白 N 区; 枯草杆菌; 抗真菌活性; 活性区域

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 02-0064-04

以白念珠菌为首的病原真菌引起的机会性深部真菌感染已成为免疫缺陷病人死亡的首要原因, 对免疫受损病人的生命构成了直接威胁。因此, 寻找高效低毒的抗真菌药物特别是抗白念珠菌的药物显得非常重要。嗜铬粒蛋白 (Chromogranin A, CGA) 是存在于大多数分泌细胞和神经元的一种可溶性蛋白^[1-2]。研究表明: CGA 的 N 端具有抗血管收缩、抗细菌和抗真菌等功能^[3], 是一类很有研究价值的多肽。Lugardon K 的研究表明 CGA N 端 Cys17-Cys38 之间的二硫键对 CGA 抗细菌活性具有重要作用^[4]。为摆脱 CGA1-17 的抗细菌活性和寻找较短且具有较高抗真菌活性的片段, 本研究应用 PCR 技术, 以 CGA cDNA 为模板, 扩增了编码其 N 端 18-76、18-66 和 31-76 位氨基酸 (CGA18-76、CGA18-66 和 CGA31-76) 的 DNA 片段, 克隆至枯草杆菌诱导型表达载体, 实现了 3 个片段在枯草杆菌中的分泌表达, 为研究和开发小分子的抗真菌药物提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株与质粒 *E. coli* DH5 α 、*B. subtilis* DB1342 由本室保存; 烟曲霉菌、黄曲霉菌、石膏样小孢子菌和白念珠菌由中山大学生命科学学院保

存; pSBPTQ 由本室构建^[5]; pGhCGA 由 Heiman 博士惠赠。

1.1.2 培养基与主要试剂 枯草杆菌、大肠杆菌培养用 LB 培养基; 丝状真菌培养用 PDA 培养基; 白念珠菌培养用 YPD 培养基; 枯草杆菌感受态制备用 GM I、GM II 培养基。各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq 酶及其他修饰酶购自 NEB、GIBCO-BRL 和华美生物公司; 引物由上海生工公司合成; 蛋白质相对分子量标准购自 Promega 公司。

1.2 方 法

1.2.1 PCR 扩增 以 CGA cDNA 为模板进行 PCR 反应, 扩增条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min; 58℃退火 30 s; 72℃延伸 1 min, 共进行 30 个循环; 最后 72℃延伸 10 min。

1.2.2 分子克隆技术 DNA 酶切、连接、大肠杆菌转化按 Sambrook 的方法进行^[6]。枯草杆菌转化参考文献 [7]。

1.2.3 CGA18-76、CGA18-66 和 CGA31-76 基因的表达 接种单菌落于含卡那霉素的 LB 培养基中, 37℃快摇过夜。按 5% 接种量接入新鲜的含相应抗生素的 LB 培养基中, 37℃快摇 2 h 后加蔗糖至终质量浓度为 2%, 继续摇 24 h, 离心取上清进行抑菌活性分析。

^{*} 收稿日期: 2005-06-27
基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (011207)
作者简介: 李瑞芳 (1971 年生), 女, 博士, 讲师; 通讯联系人: 罗进贤; E-mail: lsbr02@mail.sysu.edu.cn
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2.4 表达产物抗真菌活性分析 利用孔穴琼脂扩散法检测工程菌表达产物的抑制真菌活性, 并与 CGA 1-76 进行比较。CGA 1-76 的制备参见文献 [5]。取适量丝状真菌孢子悬液和白念珠菌悬液分别涂 PDA 和 YPD 平板, 用直径 7 mm 无菌打孔器在平板的合适位置打孔, 将表达上清加入孔内, 于 30 ℃ 静置培养, 根据抑菌圈大小判断抑菌强弱。

2 结果与讨论

2.1 CGA 18-76、CGA 18-66 和 CGA 31-76 基因的扩增

根据已发表的 CGA cDNA 序列合成:

- 引物 1: 5'-AA CTGCAG AA ATC GTT GAG GTC ATC TAC-3'
- 引物 2: 5'-AA CTGCAG AA CCC ATG CCT GTC AGC AAC-3'
- 引物 3: 5'-GG GGTACC TTA GAG AGC GAG GTC TTG GAG-3'
- 引物 4: 5'-GG GGTACC TTA CTG CTG ATG TGC CCT CTC-3'

引物 1 和引物 4 扩增 CGA 18-76 基因, 引物 2 和引物 4 扩增 CGA 31-76 基因, 引物 1 和引物 3 扩增 CGA 18-66 基因。为方便操作, 在引物 1、2 的 5 端添加 *Pst*I 酶切位点、引物 3、4 的 5 端添加 *Kpn*I 酶切位点 (见引物下划线处序列)。在 *Pst*I 位点后添加两个核苷酸 A、A, 使目的基因和信号序列之间的读码框正确。故加工成熟后的表达产物与天然片段相比, 在 N 端多出 Thr Ala Glu 3 个氨基酸。在引物 3、4 的 5 端添加终止密码子, 使翻译在设定位置终止。进行 DNA 序列分析, 测定的序列与已报道的人 CGA 的 DNA 5 端编码 18-76、31-76 和 18-66 位氨基酸的核苷酸序列一致, 且信号肽序列和外源基因之间读码框正确。

2.2 含 CGA 18-76、CGA 18-66 和 CGA 31-76 基因重组质粒的构建及酶切分析

含 CGA 18-76、CGA 18-66 和 CGA 31-76 基因的重组质粒的构建如图 1 (a)。将 pSBPTQ 用 *Pst*I 进行部分酶切, 电泳回收 7.5 kb 大片段, 再用 *Kpn*I 酶切, 电泳回收 7.5 kb 大片段, 与经 *Pst*I 和 *Kpn*I 酶切的 PCR 产物连接, 分别构建含 CGA 18-76、CGA 18-66 和 CGA 31-76 基因的重组质粒。连接产物转化 *E. coli* DH5 α , 菌落直接 PCR 挑选阳性克隆。阳性克隆经培养后, 提取质粒, 用 *Pst*I 和 *Kpn*I 进行酶切, 结果如图 1 (b)。pSBPTQ 用 *Pst*I 和 *Kpn*I 酶切后, 切出 2 条带。阳性重组质粒用 *Pst*I 和 *Kpn*I 酶切后切出 3 条带, 多出的条带

大小为 189 bp、158 bp 和 149 bp 分别与 CGA 18-76、CGA 18-66 和 CGA 31-76 PCR 产物大小相同, 说明重组质粒构建正确, 分别命名为 pSC 18-76、pSC 18-66 和 pSC 31-76。

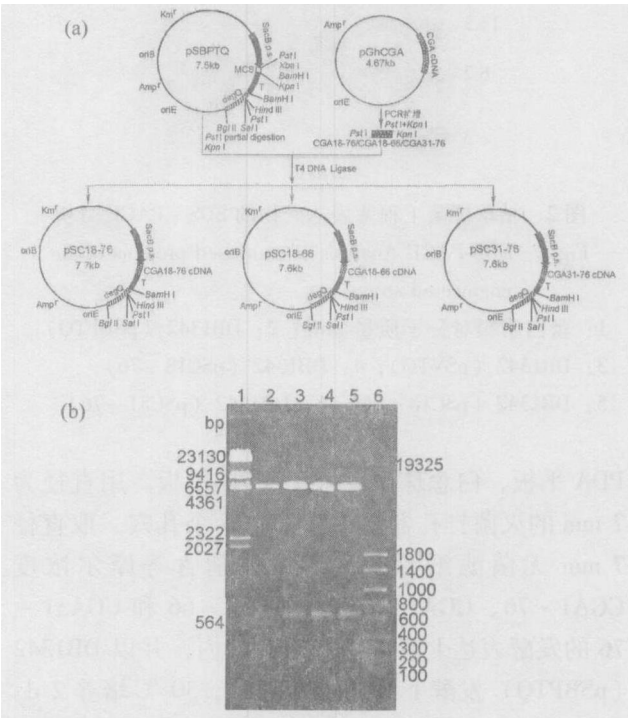


图 1 重组质粒 pSC 18-76、pSC 18-66 和 pSC 31-76 的构建与酶切分析

Fig 1 Construction and restriction analysis of the recombinant plasmid pSC 18-76 pSC 18-66 and pSC 31-76

(a) pSC 18-76 pSC 18-66 和 pSC 31-76 的构建;

(b) pSC 18-76 pSC 18-66 和 pSC 31-76 酶切分析

1: λ cI857S7 *Hind*III; 2 pSBPTQ *Pst*I + *Kpn*I ;

3 pSC 18-76 *Pst*I + *Kpn*I ;

4 pSC 18-66 *Pst*I + *Kpn*I ;

5 pSC 31-76 *Pst*I + *Kpn*I ;

6 DNA 相对分子质量标准

2.3 CGA 1-76、CGA 18-76、CGA 18-66 和 CGA 31-76 基因在枯草杆菌中的表达

分别将 pSVTQ (构建过程见参考文献 [5])、pSC 18-76、pSC 18-66 和 pSC 31-76 四种重组质粒转化枯草杆菌菌株 DB1342 各挑一高表达菌株单菌落诱导表达 24 h 后, 表达上清进行 SDS-PAGE 扫描积分分析, CGA 1-76、CGA 18-76、CGA 18-66 和 CGA 31-76 表达量分别为 5、5.6、5.3 和 5.6 mg/L。

2.4 CGA 1-76、CGA 18-66、CGA 18-76 和 CGA 31-76 的抗真菌活性

取 100 μ L 相对密度为 10^4 孢子/mL 的黄曲霉菌、烟曲霉菌和石膏样小孢子菌的孢子悬液分别涂

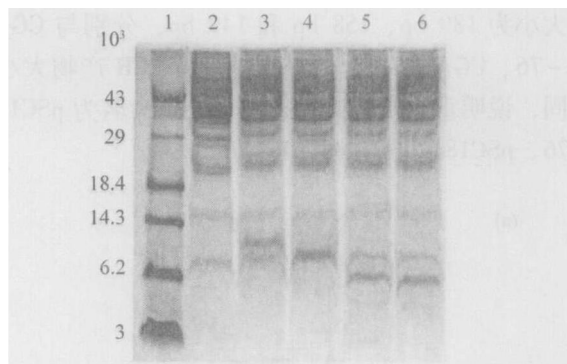


图 2 枯草杆菌工程菌表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS PAGE Analysis of expressed proteins of the engineered strains

- 1: 蛋白质相对分子质量标准; 2 DB1342 (pSBPTQ); 3 DB1342 (pSVTQ); 4 DB1342 (pSC18-76); 5 DB1342 (pSC18-66); 6 DB1342 (pSC31-76)

PDA 平板, 白念珠菌悬液涂 YPD 平板。用直径为 7 mm 的灭菌打孔器在平板上打 5 个孔穴, 取直径 7 mm 无菌滤纸片封底。将分别含等摩尔浓度 CGA 1-76、CGA 18-76、CGA 18-66 和 CGA 31-76 的发酵表达上清无菌加入孔穴内, 并以 DB1342 (pSBPTQ) 发酵上清做阴性对照, 30 °C 培养 2 d。由图 3 可知重组的 CGA 18-76、CGA 18-66 和 CGA 31-76 对烟曲霉菌、黄曲霉菌、石膏样小孢子菌和白念珠菌均有抑制作用, CGA 18-76 的抑菌作用与 CGA 1-76 相似, 对测试真菌的抑制作用弱, CGA 18-66 对测试真菌的抑制作用最强, CGA 31-76 对白念珠菌的抑制作用具有很高的特异性。

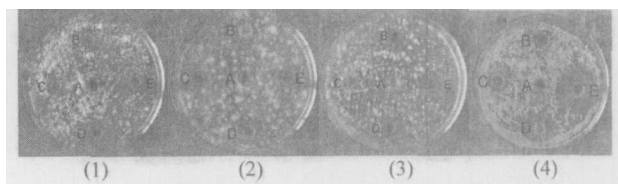


图 3 重组片段对真菌生长的抑制作用

Fig. 3 Inhibition of recombinant on the growth of different fungi

- A: DB1342 (pSBPTQ) 蔗糖诱导培养上清; B: CGA 1-76; C: CGA 18-76; D: CGA 18-66; E: CGA 31-76
(1) *A. fumigatus*; (2) *A. flavus*; (3) *M. gypseum*; (4) *C. albicans*

CGA 在体内含量甚微。为了得到研究所需样品, 我们应用 PCR 技术, 以 CGA cDNA 为模板, 选择扩增基因片段, 克隆至枯草杆菌诱导型表达载体, 在枯草杆菌中进行表达。

CGA N 端 Cys17-Cys38 之间的二硫键对 CGA 抗菌活性具有重要作用^[3], 为了摆脱 CGA 1-17 的抗菌活性和寻找较短且具有较高抗真菌活性的片段, 我们选 CGA 第 17 位氨基酸以后的序列 CGA 18-76、CGA 18-66 和 CGA 31-76 作为研究片段, 并与 CGA 1-76 进行抗真菌活性比较, 发现 CGA 1-17 对 CGA 1-76 抗真菌活性没有影响。CGA 18-66 与 CGA 18-76 相比, 在 C 端缩短了 10 个氨基酸。通过比较 CGA 18-66 和 CGA 18-76 两个片段的抗真菌活性, 发现 CGA 67-76 对 CGA 18-76 抗真菌活性具有抑制作用。通过比较 CGA 31-76 与 CGA 18-76 和 CGA 18-66 的抗真菌活性, 发现 CGA 18-30 对 CGA 18-76 和 CGA 18-66 抗白念珠菌活性具有抑制作用。因此, 可以推测 CGA N 端抗真菌活性可能集中在 CGA 18-66 区域内。从 CGA 31-76 对烟曲霉菌、黄曲霉菌、石膏样小孢子菌和白念珠菌表现不同程度的抑制作用, 可以推测 CGA 18-30 和 CGA 66-76 对 CGA N 端片段抗真菌活性的影响不同, 其具体机制尚需进一步实验来证实。

参考文献:

- [1] SMON J P, AUN S D. Biochemistry of the chromogranin A protein family [J]. *Biochem J* 1998 262: 1-13.
- [2] HELLE K B. Chromogranins: universal proteins in secretory organelles from paramecium to man [J]. *Neurochemistry International* 1990 17(1): 165-175.
- [3] LUGARDON K, RAFFNER R, GOUMON Y, et al. Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A [J]. *Journal of Biological Chemistry* 2000 275(15): 10745-10753.
- [4] LUGARDON K, CHASSEROT-GOLAZ S, KIEFFER A E, et al. Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide [J]. *Journal of Biological Chemistry* 2001 276(38): 35875-35882.
- [5] 李瑞芳, 罗进贤, 张添元. 嗜铬粒蛋白 N 端片段基因在枯草杆菌中的表达及表达产物的活性分析 [J]. *生物工程学报*, 2004 20(2): 274-278.
- [6] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular cloning: A laboratory manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [7] SPZIZEN J. Transformation of biochemically deficient strain of *B. subtilis* by deoxyribonucleate [J]. *Proceedings of National Academy of Science USA* 1958 44: 1072-1078.

Antifungal Activity Fragments of N Domain of Chromogranin A

LIRui-fang, ZHANG Tian-yuan, LUO Jin-xian, WANG Fang-yu, GU Quliang, GAN Jing-jing, XIAO Fan
(Key Laboratory of Genetic Engineering of Ministry of Education / School of Life Sciences
Sun Yat sen University Guangzhou 510275 China)

Abstract To find antifungal compounds with low toxicity to mammalian cells, the DNA fragments encoding the N terminal 18-76, 18-66 and 31-76 amino acid sequences (CGA 18-76, CGA 18-66 and CGA 31-76) of human CGA were amplified by PCR technique. The amplified DNA fragments were cloned into the *Bacillus subtilis* inducible expression vector pSBPTQ and the resultant plasmids pSC18-76, pSC18-66 and pSC31-76 were then transformed into *B. subtilis* strain DB1342 competent cells respectively. SDS-PAGE results showed that CGA 18-76, CGA 18-66 and CGA 31-76 were expressed by sucrose induction and secreted into the medium with a yield of 5.6 mg/L, 5.3 mg/L and 5.6 mg/L respectively. The antifungal activity of the expressed products was examined and compared with CGA 1-76. The results demonstrate that all four fragments CGA 1-76, CGA 18-76, CGA 18-66 and CGA 31-76 inhibit the growth of *A. fumigatus*, *A. flavus*, *M. gypseum* and *C. albicans*, while CGA 31-76 has the highest inhibition activity specifically on *C. albicans*, and CGA 18-66 shows the strongest inhibition on these fungi except *C. albicans*, and CGA 18-76 shows the weakest inhibition on these fungi.

Key words chromogranin A N domain; *Bacillus subtilis*; antifungal activity; active domain

(上接第 63 页)

Synthesis a New Binuclear Acenaphthene diimine /nickel Catalyst and Its Catalysis on Ethylene Polymerization

JIANG Hong-lu, HU Yang-jian, WANG Hai-hua
(School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract A binickel centre catalyst was prepared by Schiff base condensation of acenaphthenequinone with 4,4'-methylene bis (2,6-diisopropyl aniline), and subsequent metathesis reaction with (DME) NiBr₂. The complex was characterized by ¹H and ¹³C NMR and EA. The distance of the new catalyst between every two active centres was controlled to result in a micro chemical environment of nickel centre being regulated. The catalyst could be used to polymerize ethylene with high activity using diethylaluminum chloride as cocatalyst at lower Al/Ni ratios and high branched polyethylenes can be obtained. The highest catalytic activity was high up to 1.76 × 10⁶ g · mol⁻¹ · h⁻¹ at 40 °C with Al/Ni mole ratio at 1/000. It was found that polymerization conditions such as the cocatalyst, Al/Ni ratio and temperature had a pronounced effect on catalytic activity and properties of the produced polyethylenes.

Key words α-dimine binickel centre catalyst; ethylene polymerization; diethylaluminum chloride