

# 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

李瑞芳 罗进贤\* 张添元

(中山大学生命科学学院, 基因工程教育部重点实验室, 广州 510275)

**摘 要** 嗜铬粒蛋白(CGA)是存在于分泌细胞的由 439 个氨基酸组成的可溶性蛋白。近年的研究发现 CGA 的 N 端具有抗血管收缩、抗细菌和抗真菌的功能。为了寻找高效低毒的抗真菌片段,利用 PCR 技术扩增了编码人嗜铬粒蛋白 N 端 1-76 位氨基酸(CGA1-76)的 DNA 片段,并将之克隆进本实验构建的枯草杆菌诱导型表达载体 pSBPTQ,获得含 CGA1-76 基因的重组质粒 pSVTQ,转化蛋白酶三缺陷的枯草杆菌 DB403。经蔗糖诱导后,CGA1-76 片段在枯草杆菌 DB403(pSVTQ)中获得表达,产物分泌到细胞外,分泌量约为 5mg/L,占总分泌蛋白的 13.3%。测试了表达产物对几种丝状真菌和酵母的抑制作用,发现在 4 $\mu$ mol/L 的浓度下,枯草杆菌表达的重组 CGA1-76 对镰刀菌、链格孢霉及白假丝酵母有明显的抑制作用。

**关键词** 嗜铬粒蛋白 N 区,基因表达,枯草杆菌,抗真菌活性

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0274-05

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,由 439 个氨基酸残基组成<sup>[1,2]</sup>。近年的研究表明,CGA 是许多具有生物活性的可溶性小肽的前体。CGA 上有一些保守的氨基酸是潜在的蛋白酶水解位点,经过自然水解产生各种衍生多肽如 CGA248-293 具有抑制胰岛素分泌的功能,CGA347-419 能抑制甲状旁腺细胞的分泌<sup>[3-6]</sup>。Lugardon 等的研究表明天然牛 CGA N 区 1-76 具有抗血管收缩、抗细菌和抗真菌等功能,对真菌的抑制作用尤其明显,在微摩尔每升的浓度范围内,天然的牛 CGA1-76 片段就能抑制多种丝状真菌和酵母的生长<sup>[7]</sup>,是一类很有研究价值的多肽,而国内外有关这方面的应用研究很少。由于 CGA1-76 在动物体内含量甚微,不能满足研究的需要。枯草杆菌是一种非致病性的微生物,对人畜无害,又具有完善的分泌系统,能将外源基因产物分泌至胞外,有利于外源产物的纯化和回收<sup>[8-9]</sup>。考虑到临床上真菌感染如白假丝酵母等条件病原真菌引起的深部感染病例的不断增多和寻找高效低毒的抗真菌化合物的需要<sup>[10]</sup>,本研究应用 PCR 技术,以 CGA 为模板,扩增了编码其 N 端 1-76 位氨基酸(CGA1-76)的基因片段,克隆至枯草杆菌诱导型表达载体,实现了 CGA1-76 在枯草杆菌的分泌表达,并研究了重组的 CGA1-76 的抗真菌活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒:本实验所用菌株与质粒见表 1。

1.1.2 培养基:枯草杆菌、大肠杆菌培养用 LB 培养基,真菌培养用 SBD 培养基,枯草杆菌感受态制备用 GMI、GMI<sup>+</sup>培养基<sup>[11]</sup>;发酵用 2 $\times$ MSR 培养基<sup>[12]</sup>。

1.1.3 主要的酶和试剂:各种限制酶、T4 DNA 连接酶、Taq 酶及其他修饰酶购自 New England Biolabs、GIBCO-BRL 和华美生物公司;引物由上海生工公司合成;蛋白分子量标准购自 Promega 公司;小鼠单克隆抗体 5A8(抗 CGA47-68)由意大利 Anglo CORTI 博士惠赠;山羊抗鼠 HRP-IgG 购自华美生物工程公司;其余为国产分析纯试剂。

### 1.2 实验方法

1.2.1 PCR 扩增:以 Chromogranin A cDNA 为模板进行 PCR 反应,扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1min,58 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,共进行 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.2.2 DNA 酶切、连接、质粒转化:DNA 酶切、连接、大肠杆菌转化按 Sambrook 的方法进行<sup>[15]</sup>。枯草杆菌转化采用感受态转化法,按文献[11]方法进行。

1.2.3 序列分析:用 PCR 的两端引物对含 CGA1-76 基因的

收稿日期 2003-07-21,修回日期 2003-10-16。

基金项目 广东省自然科学基金资助(No.011207)。

\* 通讯作者。Tel:86-20-84112397;E-mail:lsbr02@zsu.edu.cn

重组质粒进行测序,由上海博亚公司完成。

**1.2.4 CGA1-76 基因在枯草杆菌中的表达** 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

入含相应抗生素的 2XMSR 培养基中,37℃ 快摇 2h 后加蔗糖至终浓度为 2%,继续摇 30h,4℃ 10 000r/min 离心 10min,去除菌体,上清进行超滤浓缩。

表 1 菌株和质粒  
Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Gene type	Origins
<i>E. coli</i> DH5α	supE44 Δlac U169 thi-1 relA1 (φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96	Store in this laboratory
<i>B. subtilis</i> DB403	<i>his nprR2 nprE18 aprAS epr</i>	Dr. Doi, UC Davis, USA
<i>Fusarium</i> sp.		Section of Microbiology, Zhongshan Univ.
<i>Candida albican</i>		Section of Microbiology, Zhongshan Univ.
<i>Alternaria</i> sp		Pathogenic Fungi Center, South China Agricultural Univ.
pPBQ7	Km <sup>r</sup> , <i>B. pumilus</i> degQ	This Laboratory <sup>[12]</sup>
pChCGA	Amp <sup>r</sup> , Chromogranin A cDNA	Dr. Helman LEE, USA <sup>[13]</sup>

**1.2.5 SDS-PAGE 及免疫印迹分析** SDS-PAGE 方法参见文献 [16], Western-blotting 按 Sambrook 的方法进行<sup>[15]</sup>, 以小鼠单克隆抗体为第一抗体, 山羊抗鼠 HRP-IgG 为第二抗体。

**1.2.6 蛋白质含量的测定** 总蛋白的测定用 Bradford 方法。SDS-PAGE 凝胶光密度积分扫描分析在 Kodak 公司的 EDAS120 型凝胶成像系统上进行, 扫描分析采用 Pharmacia Biotech 公司的 ImageMaster 软件。

**1.2.7 CGA1-76 活性分析** 将丝状真菌孢子悬液和白假丝酵母悬液稀释到适当浓度(10<sup>4</sup> 个/mL 和 10<sup>5</sup> 个/mL) 加诱导培养上清, 30℃ 静止培养 24 h, 观察试管底部菌体沉淀和菌丝球情况。振荡重悬菌体和菌丝球, 取培养物涂片镜检。

## 2 结果与讨论

### 2.1 枯草杆菌高效诱导表达分泌载体 pSBPTQ 的构建

将大肠杆菌质粒 pSP72 的复制起点及氨基青霉素抗性基因转移到枯草杆菌质粒 pUB18 上构建了大肠杆菌-枯草杆菌穿梭型克隆载体 pSB。然后将枯草杆菌 *sacB* 基因的启动子-信号肽序列 (*sacB* P.S.) 及地衣芽孢杆菌 α-淀粉酶基因的转录终止信号 (T<sub>amy</sub> T) 克隆进 pSB, 获得诱导型表达-分泌载体 pSBPT。最后将短小芽孢杆菌正调控基因 *degQ* 引入 pSBPT, 获得重组质粒 pSBPTQ。整个构建过程见图 1 (酶切电泳分析图略)。

### 2.2 CGA1-76 基因的扩增

根据已发表的 CGA cDNA 的序列合成如下两段引物:

引物 1: 5'-AA CTGCAG AA CTC CCT GTG AAC AGC CCT-3'

引物 2: 5'-GG GGTACC TTA CTG CTG ATG TGC CCT CTC-3'

为方便操作, 在引物 1 的 5' 端添加 *Pst* I 酶切位点、引物 2 的 5' 端添加 *Kpn* I 酶切位点。

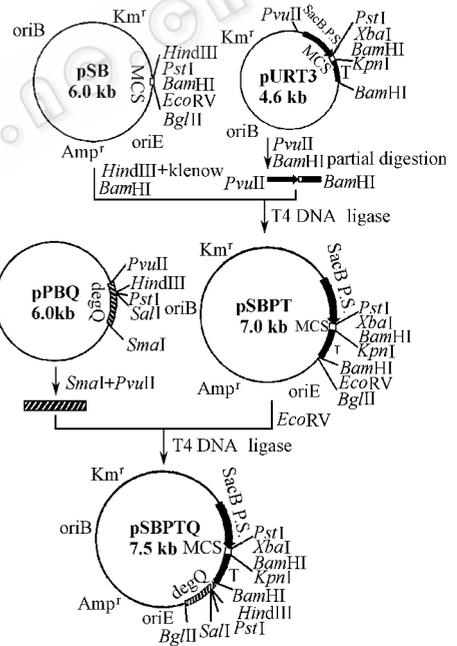


图 1 穿梭型诱导表达载体构建

Fig. 1 Construction of the inducible expression shuttle vector pSBPTQ  
ori B ori of *Bacillus* ;  
ori E ori of *E. coli*

在 *Pst* I 位点后添加 2 个核苷酸 A、A, 使目的基因和信号序列之间的读码框架正确。故加工成熟后的表达产物与天然 CGA1-76 相比, 在 N 端多出 Thr, Ala, Glu 3 个氨基酸。

按 1.2.1 的方法以 CGA cDNA 为模板和引物 1 与引物 2 进行 PCR 反应, 结果如图 2。PCR 扩增出一条约 240bp 的带。

DNA 序列分析, 结果如图 3。测定的序列与已报道的人 CGA 的 DNA 5' 端编码 1-76 氨基酸的核苷酸序列一致<sup>[14]</sup>。

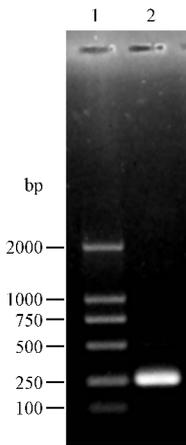


图2 扩增产物的电泳分析

Fig. 2 Gel electrophoresis analysis of PCR product  
1 :DNA ladder ; 2 :PCR product

1 ACT GCA GAA CTC CCT GTG AAC AGC CCT ATG AAT AAA  
Thr Ala Glu Leu Pro Val Asn Ser Pro Met Asn Lys  
37 GGG GAT ACC GAG GTG ATG AAA TGC ATC GTT GAG GTC  
Gly Asp Thr Glu Val Met Lys Cys Ile Val Glu Val  
73 ATC TAC GAC ACA CTC TCC AAG CCC AGC CCC ATG CCT  
Ile Tyr Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ser Pro Met Pro  
109 GTC AGC AAG GAG TGT TTT GAG ACA CTC CGA GGA GAT  
Val Ser Lys Glu Cys Phe Glu Thr Leu Arg Gly Asp  
145 GAA CGG ATC CTC TCC ATT CTG AGA CAT CAG AAT TTA  
Glu Arg Ile Leu Ser Ile Leu Arg His Gln Asn Leu  
181 CTG AAG GAG CTC CAA GAC CTC GCT CTC CAA GGC GCC  
Leu Lys Glu Leu Gln Asp Leu Ala Leu Gln Gly Ala  
217 AAG GAG AGG GCA CAT CAG CAG TAA  
Lys Glu Arg Ala His Gln Gln

图3 PCR产物的DNA序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 3 DNA sequence of PCR amplified product  
and encoding amino acid sequence

### 2.3 含CGA1-76基因重组质粒的构建及酶切分析

含CGA1-76基因的重组质粒的构建如图4(A)将pSBPTQ用Pst I进行部分酶切,电泳回收7.5kb大片段,再用Kpn I酶切,电泳回收7.5kb大片段,与经Pst I、Kpn I酶切的PCR产物连接,构建含CGA1-76基因的重组质粒。连接产物转化E. coli DH5 $\alpha$ 原位PCR挑选阳性克隆。将阳性克隆经培养后,提取质粒,用Pst I、Kpn I进行酶切。pSBPTQ用Pst I、Kpn I酶切后,电泳上可看到大小为6.9kb和0.6kb的两条带。根据该质粒的物理图谱还应切出一条带,即包括Pst I和Kpn I之间的多克隆位点,因其只有几十个碱基长,电泳时很快走出凝胶,故看不见。对含CGA1-76的重组质粒,如果CGA1-76通过Pst I和Kpn I位点与载体pSBPTQ的degQ启动子处的Pst I和MCS处的Kpn I连接,用Pst I和Kpn I酶切重组质粒时,仅能切出大小为6.9kb和0.24kb的片段。如果CGA1-76通过Pst I和Kpn I位点与载体pSBPTQ的MCS处的Pst I和Kpn I位点相连,0.24kb的CGA1-76取代了MCS,用Pst I和Kpn I酶切重组质粒时,除切出6.9kb、0.6kb两条带外,还可切出与CGA1-76 PCR产物大小相同的0.24kb片段。酶切结果显示,重组质粒用Pst I和Kpn I酶切时,切出6.9kb、0.6kb和0.24kb三条带,说明外源基因已正向连接在sacB p. s.后(图4B),将重组质粒命名为pSVTQ。

### 2.4 CGA1-76基因在枯草杆菌DB403(pSVTQ)的表达

将pSVTQ转化三种蛋白酶缺陷枯草杆菌株DB403,挑一高表达菌株按1.2.4的方法,用2%的蔗糖诱导30h,收集培养液上清进行SDS-PAGE和免疫印迹分析(见图5)。从图5可见,在8.7kD附近多一条带。用小鼠单克隆抗体5A8(抗CGA47-68)进行免疫分析,在8.7kD处出现阳性杂交带,说明重组的CGA1-76已在DB403(pSVTQ)中表达,并具有免疫原性。蛋白凝胶扫描分析显示,表达产物占分泌蛋白的13.3%相当于5mg/L。

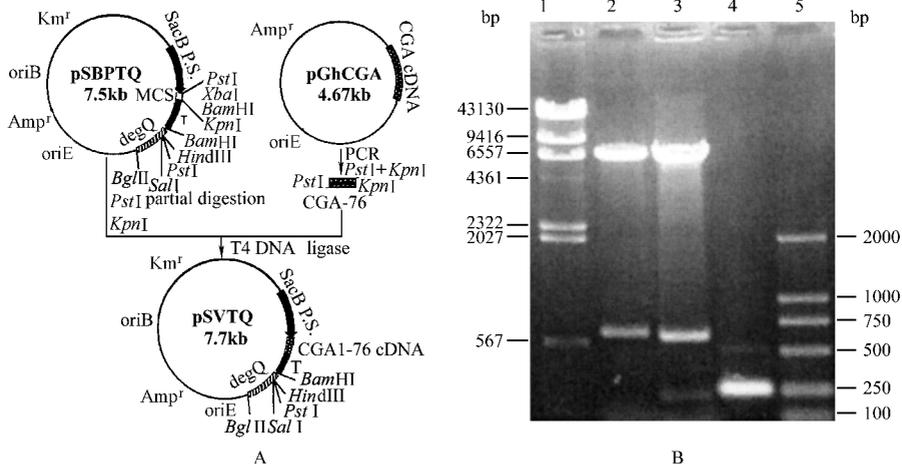


图4 重组质粒pSVTQ构建与酶切分析

Fig. 4 Construction and restriction analysis of the recombinant plasmid pSVTQ

(A) Schematic diagram of pSVTQ ; (B) Gel electrophoresis analysis

1  $\lambda$  cl857S7/Hind III ; 2 pSBPTQ/Pst I + Kpn I ; 3 pSVTQ/Pst I + Kpn I ; 4 PCR product ; 5 DNA ladder

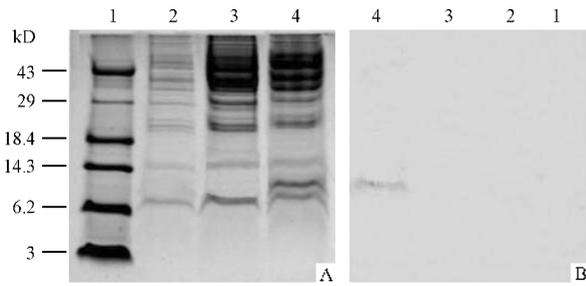


图5 枯草杆菌 DB403(pSVTQ)表达的 CGA1-76 SDS-PAGE 和免疫印迹分析

Fig.5 Analysis of expressed CGA1-76 from *B. subtilis* DB403(pSVTQ)

(A) SDS-PAGE ; (B) Western blotting.

- 1 :low range protein marker ;
- 2 :DB403(pSBPTQ) induced ;
- 3 :DB403(pSVTQ) non-induced ;
- 4 :DB403(pSVTQ) induced

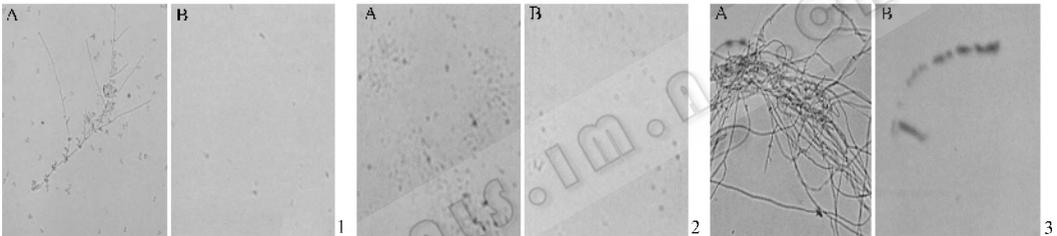


图6 重组的 CGA1-76 对 *Candida albican*(1) *Alternaria* sp.(2) *Fusarium* sp.(3) 的抑制作用

Fig.6 Inhibition of CGA1-76 on growth of *Candida albican* (1), *Alternaria* sp.(2), *Fusarium* sp.(3)

A :negative control ;B :inhibition of CGA1-76 on growth of fungi

从图片上可见 CGA1-76 对测试的三种真菌具有明显的抑制。以 CGA1-76 对 *Candida albican* 抑制作用最强,对 *Alternaria* sp. 稍差。

重组 CGA1-76 N 端多出 3 个氨基酸,是在构建表达载体时,在信号序列和基因之间引入 PstI 位点,为了维持正确读码框又添加了 2 个核苷酸引起的。多出的 3 个氨基酸在 CGA1-76 的 N 端,远离 CGA1-76 抗真菌活性中心 CGA47-66,应不会影响 CGA1-76 的抗真菌活性。根据 Lugardon K 等的报道,天然 CGA1-76 在浓度为  $10\mu\text{mol/L}$  时才对白假丝酵母有抑制作用,而在本实验中重组 CGA1-76 在浓度为  $4\mu\text{mol/L}$  时就表现出抑制白假丝酵母的作用,说明多出的 3 个氨基酸对 CGA1-76 的活性没有影响,还可能有增强作用。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Simon JP, Aunis D. Biochemistry of the chromogranin A protein family. *Biochemistry Journal*, 1989, **262** :1 - 13
- [ 2 ] Helle KB. Chromogranins : universal proteins in secretory organelles from paramecium to man. *Neurochemistry International*, 1990, **17** : 165 - 175
- [ 3 ] Taupenot L, Remacle JE, Helle KB *et al.* Recombinant human

## 2.5 表达产物抗真菌活性分析

**丝状真菌** 挑取一满环新鲜孢子于无菌 SBD 培养基中,剧烈振荡使孢子分散,用无菌棉花过滤除菌丝,于显微镜下计算孢子悬液中孢子浓度,再用新鲜的 SBD 培养液作适当稀释,使孢子悬液浓度为  $10^4$  个孢子/mL。

**酵母** :挑取一环新鲜斜面菌体于 50mL SBD 培养液中,  $30^\circ\text{C}$  180r/min 振摇过夜,显微镜下计数,待培养液菌悬液浓度达  $5 \times 10^6$  个/mL 左右时,再用新鲜 SBD 培养液作适当稀释,使菌液浓度为  $10^5$  个/mL。

将制备好的菌悬液分两管,每管 2mL,在一号管加 1mL 浓缩的 DB403(pSBPTQ)诱导培养上清,作阴性对照,以排除浓缩后的培养上清对真菌生长的干扰。二号管加 1mL 同程度浓缩的 DB403(pSVTQ)诱导表达上清,作为实验组。此时,目的蛋白 CGA1-76 的浓度为  $4\mu\text{mol/L}$ 。  $30^\circ\text{C}$  静止培养 24 h。阴性对照管底有明显的菌体或菌丝球沉淀,而加 DB403(pSVTQ)诱导上清的试验组管底几乎无沉淀。摇匀培养物,取适量涂载玻片,盖上盖玻片后,在相差显微镜下观察、拍照。结果见图 6。

chromogranin A : expression, purification and characterization of the N-terminal derived peptides. *Regulatory peptides*, 1995, **56** : 71 - 88

- [ 4 ] Fasciotto BH, Trauss CA, Greeley GH *et al.* Parastatin( porcine chromogranin A347-419), A novel chromogranin A-derived peptide, inhibits parathyroid cell secretion. *Endocrinology*, 1993, **133**( 2 ) : 461 - 466
- [ 5 ] Aardal S, Helle KB, Elsayed S *et al.* Vasostatin, Comprising N-terminal domain of Chromogranin A suppress tension in isolated human blood vessels. *Journal Neuroendocrinology*, 1993, **5** : 405 - 412
- [ 6 ] Corti A, Sanches LP, Gasparri A *et al.* Production and structure characterization of recombinant chromogranin A N-terminal fragments ( Vasostatin ) Evidence of dime-monomer equilibria. *European Journal Biochemistry*, 1997, **248** : 692 - 699
- [ 7 ] Lugardon K, Raffner R, Goumon Y *et al.* Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A. *Journal Biological Chemistry*, 2000, **275**( 15 ) : 10745 - 10753
- [ 8 ] Wong Sui-lam. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the

- 1995 **6** :517 – 522
- [ 9 ] Wu Sau-Ching ,Wong Sui-Lam. Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology* , 1999 **72** :185 – 195
- [ 10 ] Lugardon K , Chasserot-Golaz S , Kieffer AE *et al.* Structural and biological characterization of chromofungin , the antifungal chromogranin A( 47-66 )-derived peptide. *Journal Biological Chemistry* , 2001 **276**( 38 ) :35875 – 35882
- [ 11 ] Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strain of *B. subtilis* by deoxyribonucleate. *Proceeding of National Academy of Science USA* , 1958 **44** :1072 – 1078
- [ 12 ] Ye RQ , Kim JH , Kim BG *et al.* High-level secretory production of intact , biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioengineering* , 1999 , **62** :87 – 96
- [ 13 ] Li WQ( 李文清 ) ,Wang HG( 王红革 ) ,Luo JX( 罗进贤 ) *et al.* Expression of porcine growth hormone cDNA in *Bacillus*. *Chinese Biochemical Journal*( 生物化学杂志 ) ,1993 **9**( 4 ) :434 – 440
- [ 14 ] Helman LJ , Ahn TG , Levine MA *et al.* Molecular cloning and primary structure of human chromogranin A ( secretory protein I ) cDNA. *Journal Biological Chemistry* , 1988 , **263**( 23 ) :11559 – 11563
- [ 15 ] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1994
- [ 16 ] Wu GX( 吴冠云 ) ,Pan HZ( 潘华珍 ) ,Wu H( 吴攀 ) . *Experimental manual for Biochemistry and Molecular biology*. Beijing : Science Press , 1999 , pp.190 – 192

## Expression of N Domain of Chromogranin A in *Bacillus subtilis* and Its Antifungal Activity

LI Rui-Fang LUO Jin-Xian\* ZHANG Tian-Yuan

( School of Life Sciences , Key Laboratory of Genetic Engineering of Ministry of Education , Zhongshan University , Guangzhou 510275 ,China )

**Abstract** Chromogranin A ( CGA ) is a soluble protein existed in most secreted cells and neurons. It was recently found that the bovine CGA N terminal region has vaso-inhibitory , antibacterial and antifungal activities. Since the need for effective antifungal agents increases in parallel with the expanding number of immunocompromised patients at risk for fungal infections , it becomes imperative to find antifungal compounds with low toxicity toward mammalian cells. To study the antifungal activity of CGA N terminal region , the DNA fragment encoding for the N terminal 1-76 amino acid sequence ( CGA1-76 ) of human CGA was amplified by PCR technique. After DNA sequence analysis , the amplified DNA fragment was cloned into the *Bacillus subtilis* inducible and expression vector pSBPTQ constructed in this study and the resultant plasmid pSVTQ was then transformed into triple-protease deficient *Bacillus subtilis* strain DB403 competent cells. The transformants were screened on LB plates containing 10 $\mu$ g/mL kanamycin. The positive transformant DB403( pSVTQ ) was grown on kanamycin containing 2  $\times$  MSR medium and sucrose was added to 2% final concentration for induction after 2h cultivation. The culture supernatant was used to run SDS-PAGE. The result of SDS-PAGE showed that the CGA1-76 was expressed by sucrose induction and the expressed product secreted into the medium with a yield of 5mg/L. The expressed product reacts specifically with mouse anti CGA47-68 monoclonal antibody. The antifungal activity of the expressed product was examined by adding the culture supernatant to the fungal spore or *Candida albican* suspensions at appropriate proportion and found that the recombinant human CGA1-76 produced in *Bacillus subtilis* inhibits the growth of *Fusarium* sp. *Alternaria* sp. and *Candida albican* at the concentration of 4 $\mu$ mol/L. These results demonstrate that human CGA1-76 has expressed in *Bacillus subtilis* and the expressed product is immunogenic and has the antifungal activity.

**Key words** chromogranin A N domain , gene expression , *Bacillus subtilis* , antifungal activities

Received : 07-21-2003

This work was supported by Grant from the Natural Sciences Foundation of Guangdong province ( No.011207 ).

\* Corresponding author. Tel 86-20-84112397 ; E-mail lsbrc02@zsu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>