

STUDY ON THE ANTI-MICROBIAL ACTIVITY OF MOUSE BIN1B AND CONSTRUCTION OF THE TRANSGENIC MICE WITH BIN1B OVER-EXPRESSION IN EPIDIDYMIS

FEI Zhao Liang^{*,**,***} XU Guo Jiang^{**} JIANG Xia^{**} WANG Long^{**} YAN Lan Zheng^{**}

ZHANG Yong Lian^{****} WANG Zhu Gang^{**} XIA Guang Ming^{*} FEI Jian^{**,****,*****}

(* Shandong University, Jinan 250100 China)

(** Shanghai Research Center for Biomodel Organism, Shanghai 201203 China)

***Institute of Biochemistry and Cell Biology, SIBS, CAS, Shanghai 200031 China)

ABSTRACT The cDNA of mouse Bin1b homolog(mBin1b) protein was subcloned into expression vector of pCDNA3 and transiently expressed in COS-7 cells. The expression of mBin1b in COS-7 cells was identified by RT-PCR. The anti-microbial activity of the transfected cell culture supernatant was confirmed by plating on growth media. Adding a HA tag to the C-terminus of mBin1b (mBin1b-HA) resulted in the same anti-microbial activity as the mBin1b protein. This result indicated that anti-microbial activity was not located at the C terminus of mBin1b. To study the function of mBin1b in vivo, the Tet-on gene expression regulation system was used to construct transgenic mice. Two lines of transgenic mice were obtained, one in which the mBin1b-HA cDNA was under the control of the TRE promoter, and the other with rtTA specifically expressed using the promoter of the mE-RABP gene in the epididymis. Crossing the two transgenic lines will produce inducible over-expression of mBin1b specifically in epididymis. This research will provide a useful mice model to study the function of mBin1b in vivo.

Key words: Antimicrobial peptide Bin1b Transgenic mice

We thank Dr. Kichiya Suzuki for providing the mE-RABP gene promoter DNA. This study was supported by Chinese Academy of Sciences.

**** Corresponding author. E-mail: jfei@sibs.ac.cn

一种新的精子结合蛋白 HBRP 在原核表达及其活性研究

罗 阳* 宗志宏** 于秉治**

(中国医科大学* 卫生部细胞生物学重点实验室医学基因组学研究室** 生物化学教研室 沈阳 110001)

摘 要 为了发现和研究牛精浆(bovine seminal plasma, BSP)蛋白及其相关蛋白在受精及受精卵发育中的重要作用,我们克隆了人类生殖相关新基因 HBRP(Human BSP-Related Proteins),本文通过基因重组技术,构建了 GST-HBRP 融合蛋白表达质粒,在大肠杆菌中获得大量表达,并检测了该蛋白对 PKC 活性的影响。

关键词: HBRP 原核表达 GST-融合蛋白 PKC 活性

我们首先在人生殖系统睾丸组织中发现并克隆了一个与牛精浆(bovine seminal plasma, BSP)蛋白相关基因的 cDNA 序列(登录号为 AF27914)^[1],其开放阅读框架(open reading frame, ORF)编码了一个含 223 个氨基酸残基的蛋白质,氨基酸序列中含有四个纤连蛋白 II 结构域,与 BSP 蛋白在结构上具有一定的相似性,称其为人 BSP 相关蛋白(Human BSP-Related Proteins, HBRP),预测该蛋白是与 BSP

蛋白功能相关的精子结合蛋白。本文通过基因重组技术,构建了 GST-HBRP 融合蛋白表达质粒,并在大肠杆菌中大量获得表达蛋白,由于本室在前期研

本文 2003 年 4 月 21 日收到,5 月 29 日接受。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(No. G1999055900-2)及国家自然科学基金资助项目(No. 39730460)。

* 联系人。E-mail: luoyangji@sina.com

究中发现 BSP 蛋白具有抑制蛋白激酶 C (Protein Kinase C, PKC) 的作用, 因此我们检测了 HBRP 表达蛋白对 PKC 活性的影响, 对进一步研究新蛋白的生物学功能具有重要的意义。

材料与方 法

1. 质粒和菌株

GST 融合表达载体 pGEX-5X-1 和 *E. coli* BL21 购于 Pharmacia 公司, pMD18-T Vector 和感受态细胞 *E. coli* JM109 为 TaKaRa 公司产品。

2. 主要试剂

plasmid mini purification kit 25 为 Qiagen 公司产品, 小鼠 GST 单克隆抗体、GST Purification Module 以及 IPTG 为 Pharmacia 公司产品, 限制性内切酶、Taq DNA polymerase、连接酶等为 TaKaRa 公司产品, [γ - 32 P]ATP 购于北京亚辉生物制品公司。

3. 引物设计与合成

根据得到的 HBRP cDNA 序列进行引物的设计, 5' 端引物包含起始密码并引入 *Bam*H I 酶切位点, 3' 端引物包含终止密码并引入 *Xho* I 酶切位点, 引物序列如下, 引物由 TaKaRa 公司合成。

引物 1: 5'-CG GGATCCAGATGACCCGATGGTCCAGTTACCTG-3'
BamHI

引物 2: 5'-CCG CTCGAGTCTGTGCTCAGCCTCAGTATGGCGG-3'
Xho I

4. PCR 扩增和 DNA 回收

以克隆有 HBRP 全长 cDNA 序列的 pMD-18T Vector/HBRP 质粒为模板, 使用高保真 Pyrobest DNA polymerase, 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系为 50 μ l, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 1min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 3min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 3min; 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。采用酚/氯仿抽提法沉淀 PCR 产物。

5. HBRP 基因表达载体构建

分别将沉淀后的 PCR 产物和 GST 融合表达载体 pGEX-5X-1 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测限制性酶切后的 PCR 产物和载体, 回收纯化后 16 $^{\circ}$ C 3 小时完成连接反应, 连接物转化 *E. coli* BL21 感受态菌, 同时转化不插入外源 DNA 的自连载体作为对照, 应用菌落 PCR 的方法鉴定重组阳性克隆。质粒 DNA 提取, 双酶切进一步鉴定插入片段。选择阳性克隆进行 DNA 序列测定分析, 确定正确阅读框架克隆。

6. GST-HBRP 融合蛋白的表达

将正确读框的单克隆菌接种于 2 \times YT 液体培养基 (含 Amp100 μ g/ml) 培养至 A_{600} 为 0.5-1 时, 加入终浓度为 0.1mmol/L 的 IPTG, 诱导表达 3-5 小时, 离心收集菌体, PBS 洗涤, 超声波破碎后, 加入 TritonX-100 至终浓度为 1% 后混匀, 离心收集上清, 即为蛋白质粗提液, SDS-PAGE 检测

表达情况。并用凝胶灰度扫描确定蛋白表达量。

7. Western 免疫印迹分析

经初步纯化的 GST 蛋白以及融合蛋白用 12% SDS-PAGE 分离, 然后转移到硝酸纤维素膜上, 用含 2% BSA 的 TBST 封闭。鼠 GST 单克隆抗体用作一抗, 碱性磷酸酶偶联的羊抗鼠 IgG 作为二抗, 用 NBT/BCIP 底物显色。

8. PKC 活性的测定

从大鼠脑中分离纯化 PKC^[2], 采用酚试剂法测定蛋白浓度。以 Histone H1 为底物, [γ - 32 P]-ATP 标记测定 PKC 活性^[3], 反应总体积为 50 μ l, 含 20mmol/L Tris-HCl pH7.5, 5mmol/L MgAc₂, 0.5mmol/L CaCl₂, 2 μ gPS, 40ng DG, 0.01mmol/L [γ - 32 P]-ATP, 0.5% Histone H1。30 $^{\circ}$ C 水浴反应 7 分钟, 取反应液点于 Whatman P18 强阳离子交换滤纸上 (1.5 \times 2cm), 用 LS 3081 Beckman 液闪计数器测定 cpm 值, 收集有活性部分。

9. 重组蛋白对 PKC 活性的影响

使用 GST Purification Module 分别纯化前述步骤蛋白粗提液中的 GST 和 GST-HBRP 融合蛋白, 用还原型谷胱甘肽洗脱, 测定洗脱液中蛋白含量。按上述方法以 Histone H1 为底物, [γ - 32 P]-ATP 标记, PKC 的加入量为 0.4 μ g 并设 PKC 空白对照组, 分别检测不同浓度的 GST 蛋白及 GSP-HBRP 融合蛋白对 PKC 活性的影响。

结 果

1. HBRP 基因 PCR 产物的鉴定

将克隆有 HBRP 基因 cDNA 序列的 pMD-18T/HBRP 质粒作为模板, 扩增出与预计长度相符的 800bp 的 HBRP 基因特异性片段 (图 1)。并引入了相应的酶切位点。

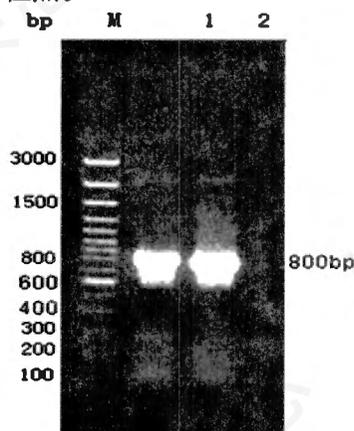


图 1 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析

M. 100bp ladder DNA marker;
1, 2. HBRP 基因 PCR 扩增产物。

2. HBRP 表达载体的构建

将 PCR 产物和 pGEX-5X-1 质粒均以 *Bam*H I/*Xho* I 双酶切后连接, 即将 HBRP 基因克隆入

GST融合表达载体,转化 *E. coli* BL21 感受态菌,在含 Amp 的 LB 固体培养基上筛选转化的菌落,菌落 PCR 鉴定获得 13 个重组阳性克隆(图 2)。

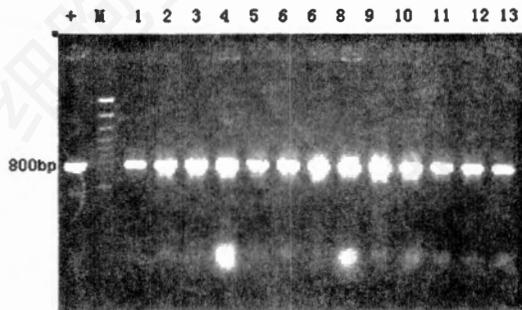


图 2 HBRP 基因片段插入后菌落 PCR 筛选结果
+. 阳性对照;M. DNAMarker;1-13 菌落 PCR 扩增产物。

3. 限制性内切酶鉴定分析

我们对经菌落 PCR 筛选得到的阳性克隆菌落提取质粒 DNA,经 *Bam*H I/*Xho* I 双酶切鉴定,结果可见到 800bp 的插入片段和 5kb 质粒条带(图 3),表明外源基因 HBRP 插入片段大小及插入方向正确。

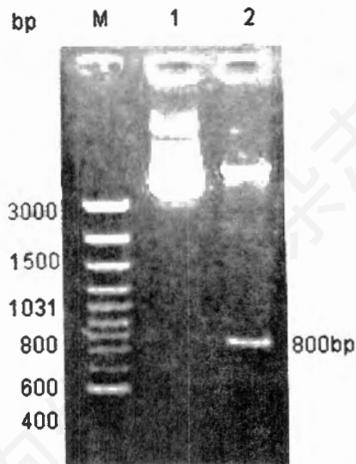


图 3 pGEX/HBRP 质粒 DNA 的双酶切结果
M. DNA marker;1. pGEX 质粒;
2. *Bam*H I/*Xho* I 双酶切产物。

4. HBRP 基因在大肠杆菌中的融合表达

将正确读框的单克隆菌在 $2 \times$ YT 培养基中经 IPTG 诱导表达,经过不同的诱导时间检测表明 IPTG 诱导 3-5 小时有较高的目的蛋白表达,SDS-PAGE 结果显示:转化有母本载体质粒 pGEX-5X-1 的 *E. coli* BL-21 可表达分子量为 26kD 的 GST 蛋白,转化有 pGEX/HBRP 的 *E. coli* BL-21 经 IPTG 诱导后,可高效表达分子量为 52kD 的蛋白,而在 26kD 处的蛋白带消失(图 4),说明插入的外源 HBRP 基因已成功地在大肠杆菌中表达,并与 GST

形成了融合蛋白。凝胶灰度扫描结果显示融合蛋白的表达量占菌体总蛋白的 32%(图 5)。

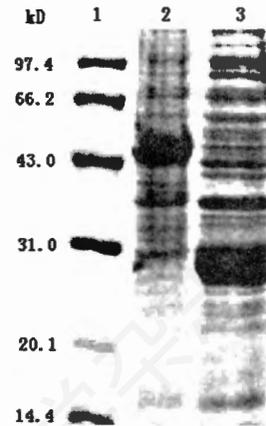


图 4 IPTG 诱导表达蛋白的 SDS-PAGE 分析结果
1. 蛋白 marker;2. GST-HBRP 融合蛋白;3. GST 蛋白。

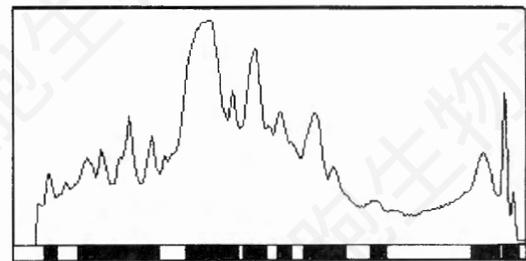


图 5 GST-HBRP 融合蛋白表达量的扫描分析图

5. Western 免疫印迹分析

用 GST 单克隆抗体进行 Western 印迹分析,结果显示与 GST 抗体结合的蛋白为 26kD 的 GST 蛋白和 52kD 的融合蛋白,证实表达的重组蛋白为含有 GST 的融合蛋白(图 6)。

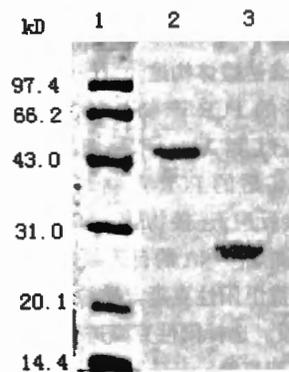


图 6 表达蛋白的 Western 印迹分析
1. 蛋白 marker;2. GST-HBRP 融合蛋白;3. GST 蛋白。

6. 重组蛋白对 PKC 活性的影响

以 Histone H1 为底物, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 标记,分别检测不同浓度的 GST 蛋白及 GST-HBRP 融合蛋白

对 PKC 活性的影响,用 LS3081 液闪仪测定 cpm 值。初步研究发现,以 GST 蛋白为内对照,重组 GST-HBRP 融合蛋白对 PKC 具有一定的抑制活性,当以 PKC 活性下降百分数表示 GST-HBRP 的抑制活性时,PKC 活性的对数与蛋白浓度之间存在一定的线性关系(图 7)。

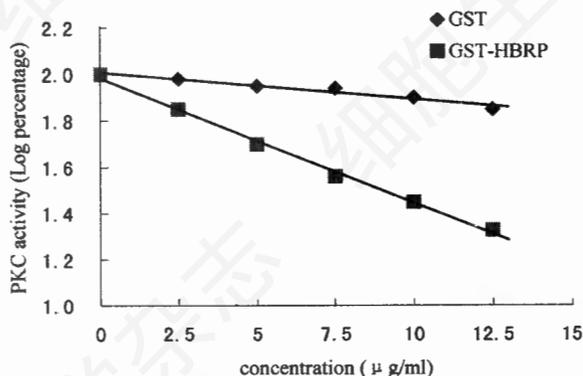


图 7 重组蛋白对 PKC 活性的影响

讨 论

HBRP 是我们首先克隆并在 GenBank 注册的人与 BSP 蛋白相关新基因,BSP 蛋白是牛精浆中的主要蛋白质。BSP 蛋白可以与胆碱或磷脂胆碱结合,黏附于精子表面,可促进由肝素、LDH 等诱导的获能过程^[4];另外 BSP 蛋白与不同来源的胶原、纤维蛋白原、肝素、钙调蛋白、IGF- II、apoA-I 等结合,还可抑制精子胞膜上的胆固醇迁移^[5],这些都暗示了 BSP 蛋白在精子胞膜的脂类代谢及调节精子的获能以及顶体反应方面发挥重要作用。目前在猪及马的精浆中都发现了与 BSP 蛋白同源的蛋白质的存在^[6],这些蛋白具有与 BSP 蛋白相似的结合特性,说明 BSP 蛋白及其同源蛋白在哺乳动物中是广泛存在的,并应具有其生理意义。而在人的生殖系统中与 BSP 功能相关的蛋白质至今未见报道。为了进一步发现和研究 BSP 及其相关蛋白在受精及受精卵发育中的重要作用,我们克隆出人与 BSP 蛋白相关基因的 cDNA 序列,并将其命名为 HBRP (Human BSP-Related Proteins)^[1]。HBRP 基因的 ORF 编码了一个含有 223 个氨基酸的蛋白质,为了进一步研究 HBRP 蛋白的生物学功能,我们首先构建了 HBRP 蛋白的原核表达质粒,拟通过基因重组获得表达蛋白,进而研究该蛋白的生物学功能。

本研究采用了 pGEX 融合蛋白表达载体,将克

隆基因表达成与 GST 相融合的蛋白质,融合蛋白是避免细菌蛋白酶破坏的较好措施,氨基端带有 GST 的融合蛋白可以通过亲和层析方便地从细菌裂解物纯化。融合蛋白纯化的条件设计为非变性条件以维持蛋白的完整性,所以获得的蛋白适合于大多数应用,包括抗体制备、大分子相互作用、分子免疫学、疫苗制备和酶学分析,并已有很多成功的例子^[7-11]。GST 序列编码了一个 26kD 的 GST 蛋白,在 GST 序列后含有一个蛋白酶切位点,在实验中我们看到,目的蛋白的读框与 GST 蛋白的一致,且蛋白的编码序列含有一个 3' 端同框终止密码是十分必要的。用细菌合成真核蛋白的一个重要限制是当蛋白以高水平表达时会形成包涵体,GST 融合表达系统虽然没有完全解决这个问题,但它可以增加外源蛋白的可溶性,在实验中我们观察到,蛋白质合成速度变慢可以使更多的蛋白可溶,这可以通过在较低的温度下培养大肠杆菌做到,或者也可以通过降低用于诱导的 IPTG 浓度来实现。以 pGEX 载体表达的 GST-HBRP 融合蛋白,具有表达的蛋白稳定性好,在体外易于纯化等特点,为下一步研究该蛋白的生物学功能提供了可靠的手段。当然,这只是该基因在原核细胞中表达的结果,为了得到与人体内功能相近的重组蛋白还应研究其在真核细胞中表达的情况。

HBRP 基因 ORF 编码的含有 223 个氨基酸的蛋白质序列同源性分析发现,与之序列最相近的是 BSP 蛋白家族,包括 BSP-A1/A2、BSP-A3 和 BSP-30kDa 蛋白质^[12],同源性为 51% - 58%,而该段序列中包括了 BSP 蛋白家族的功能结构域,从已报道的 BSP 蛋白结构特点来看,它含有两个前后排列的纤连蛋白 II 结构域,该结构与 BSP 蛋白的多种结合功能密切相关,包括与不同来源的胶原(I 型、II 型、IV 型、V 型)、纤维蛋白原、肝素、胆碱、磷脂酰胆碱、钙调蛋白、IGF- II、apoA- I 等的结合,从而参与调节脂类的转运及精子的获能等过程^[4,5,12]。而 HBRP 蛋白氨基酸序列中含有四个纤连蛋白 II 结构域,表明该蛋白可能是一种与 BSP 蛋白功能相关的结合蛋白。我室于秉治等在对 BSP 蛋白功能的初步研究过程中发现,BSP 蛋白具有 PKC 活性抑制作用(本室待发表)。PKC 是广泛分布于真核细胞特别是哺乳类动物细胞中的一种 Ca^{2+} /磷脂依赖性的蛋白激酶,它广泛参与细胞信息传递、分泌、离子通道调节、细胞增殖、分化及癌变等一系列与生命现象相关的过程^[13]。近几年的研究证明 PKC 存在于多种

动物和人的精子中,本实验室曾证明精子尾部至少存在有 α 、 β 、 ϵ 三种PKC亚型,而精子的顶体部位仅有 β 亚型的分布^[14]。另外,在精子顶体反应中,一个重要的现象就是外源性 Ca^{2+} 内流,从而导致顶体反应的发生。尽管引起这种变化的机制尚不十分清楚,但是几种与 Ca^{2+} 调节有关的信号系统已被证实,在顶体反应中亦发挥作用。而PKC在体细胞中可以激活 Ca^{2+} 通道,导致 Ca^{2+} 内流^[15]。因此PKC可能在顶体反应中亦发挥着重要的作用。本文实验中初步检测了GST-HBRP融合蛋白对PKC活性的影响,该检测过程中用表达的GST蛋白作对照,从抑制曲线上看HBRP-GST融合蛋白对PKC的活性有一定的抑制作用,这只是一个初步的研究结果,其作用机制还有待于进一步研究证实。本研究对进一步深入研究BSP及其相关蛋白的生物学功能将具有极其重要的意义。

参 考 文 献

[1] 罗阳、张学、于秉治等,2002,中国生物化学与分子生物学报,18:(2)82-87.

- [2] 于秉治,中国医科大学学报,1989,18(4):241.
 [3] Yu BZ, Xue HH, Yang Y, et al., 1995, *Biomedical Res*, 16(3):155-163.
 [4] Therien I, Bleau G, Manjunath P, 1999, *Biol Reprod*, 52:1372-1379.
 [5] Therien I, Moreau R, Manjunath P. 1998, *Biol Reprod*, 59:768-776.
 [6] Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, et al., 1997, *FEBS Lett* 407:201-206.
 [7] Dixon JE, Hakes D, Guan K. et al., 1993, *Methods Mol. Genet.*, 2:44-53.
 [8] Fikrig E, Barthold SW, et al., 1990, *Science*, 250:553-556.
 [9] Johnson KS, Harrison GBL, Lightowlers MW, et al., 1989, *Nature*, 338:585-587.
 [10] Kailin WG, Pallas DC, Decaprio JA, et al., 1991, *Cell*, 64:521-532.
 [11] Smith D B, Johnson. 1989, *Gene*, 67:31-34.
 [12] Salois D, Menard M, Paquette Y, 1999, *Biol Reprod*, 61:288-297.
 [13] Nishizuka Y. 1992, *Science*, 258:607-610.
 [14] 薛海辉、于秉治,1993,中国医科大学学报,22(专刊):5-8.
 [15] Brokaw CJ and Wassarman P. 1995, *J cell Biochem*, 35:175-184.

EXPRESSION OF A NOVEL SPERM-BINDING PROTEIN IN PROCARYOTE AND ITS ACTIVITY DETECTION

LUO Yang* ZONG Zhi Hong** YU Bing Zhi**

(* The Research center for Medical Genomics,

**Department of Biochemistry, China Medical University, Shenyang 110001 China)

ABSTRACT In order to investigate the roles of bovine seminal plasma and its related proteins in fertilization and development of zygote, we cloned human reproduction related gene HBRP(Human BSP-Related Proteins). In this study, we constructed the plasmid expressing fusion protein-GST-HBRP in *Escherichia coli*, and obtained a large amount of fusion protein. And also has been studying the impact of HBRP on PKC activity.

Key words: HBRP Expression in procaryotes GST fusion protein PKC activity

Supported by National Basic Research "973" Program(No. 1999055900-2) and National Natural Science Foundation of China(No. 39730460).

* Corresponding author. E-mail: luoyangjj@sina.com