

文章编号:1673-1689(2008)06-0086-04

设计天蚕素抗菌肽在 *E. coli* 中的表达及活性鉴定

韩晋辉^{1,2}, 翟培^{1,2}, 施用晖^{1*}, 吕文平¹

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏无锡 214122; 2. 广东食品药品职业学院, 广东广州 510520)

摘要: 为了研究天蚕素抗菌肽的构效关系, 进一步提高其抗菌活性, 收集并整理了 62 条天蚕素, 通过生物信息学比对(blast), 发现其中含有大量保守序列。在此保守序列的基础上, 根据天蚕素结构特征, 设计了 4 条抗菌肽。将设计抗菌肽的基因克隆到载体 PUC19 上, 在大肠杆菌 JM109 中融合表达目的多肽, 并促其形成包涵体。包涵体洗涤纯化后, 用溴化氰裂解除去融合蛋白质, 抑菌圈法测定其抗菌活性, 结果表明其中抗菌肽 AMP-CecC 具有较强的抑菌活性。

关键词: 天蚕素; 融合表达; 包涵体; BrCN 裂解; 抑菌活性

中图分类号: Q 78

文献标识码: A

Expression Design Cecropin in *E. Coli* and Determine Antimicrobial Activity

Han Jin-hui^{1,2}, ZHAI Pei^{1,2}, SHI Yong-hui^{1*}, LU Wen-ping¹

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

Abstract: This manuscript was to investigate the relationship of structure and function of cecropins, for this, accumulated sixty-two cecropins, utilized bioinformatics blast cecropins were accumulated, and a large sum of consensus sequence was found. Base on these consensus sequences, the cecropins structural feature we design four new antimicrobial peptides to utilize technology of genetic engineering, gene of design antibacterial peptide cloned into vector PUC19, and expressed objective polypeptide in *E. Coli* JM109. We promote expression production to be inclusion. After cleaning inclusion, utilized cyanogen bromide (CNBr) we split fusion peptide and remove fusion polypeptide. Then detect its antimicrobial activity. The design antibacterial peptide AMP-CecC has strong antibacterial activity.

Key words: cecropin; fused expression; inclusion; cyanogen bromide split; antibacterial activity

天蚕素是最早发现的昆虫抗菌肽, 它广泛存在于生物体内, 目前发现的大约有 89 种。天蚕素不仅可以作用于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌, 而且

对真菌及肿瘤细胞都有一定的杀灭和抑制作用。许多研究表明, 天蚕素抗菌肽在医药、食品、农业方面都有广阔的开发应用前景。

收稿日期: 2007-04-15.

基金项目: 中央级科研院所基础性工作专项资金重点项目(2001DEA20022).

作者简介: 韩晋辉(1978-), 男, 山西吕梁人, 工学硕士, 助理实验师。

* 通讯作者: 施用晖(1953-), 女, 江苏无锡人, 教授, 硕士生导师, 主要从事生物活性肽的研究与开发. Email: yhshi@jiangnan.edu.cn.

为研究天蚕素结构与其抗菌活性的关系,作者总结了目前天蚕素研究成果,发现天蚕素抗菌肽具有以下结构特征:1)不含半胱氨酸,不形成分子内二硫键;这使天蚕素结构较为简单,易于化学合成或者基因工程表达;2)N末端区域富含亲水碱性氨基酸残基,如赖氨酸和精氨酸;这将有利于天蚕素吸附到带负电的细菌膜上。3)C末端含较多的疏水性氨基酸残基;疏水性的尾部有利于抗菌肽插入细菌膜的双层脂质膜中。4)分子的两端各形成一个两性 α 螺旋;这种 α 螺旋是破坏、裂解细菌的主要结构^[1]。根据天蚕素以上结构特征,作者所在研究室收集整理了62种天蚕素抗菌肽序列,利用生物信息学对其进行了比对(blast),从中发现大量保守序列。在此保守序列的基础上,作者所在研究室设计了4条天蚕素抗菌肽^[2],并希望利用基因工程技术将其表达后检测其活性。

将设计的抗菌肽基因转化大肠杆菌 JM109 进行原核表达。由于天蚕素对原核生物有较强的杀伤作用,作者采用融合表达的方式,提高了诱导温度,促进融和蛋白质形成没有活性的包涵体,以减少表达产物对宿主菌的损伤和减少蛋白酶对表达产物的降解。表达融合蛋白质后,用溴化氰定向切割,除去 N 端融合蛋白质。经抑菌圈法活性检测发

现,其中抗菌肽 AMP-CecC 对革兰氏阳性菌和阴性菌均有较强抗菌活性,最小抑菌质量浓度约为 4.8 mg/L,而青霉素对测试菌种的有效抑菌质量浓度为 128 mg/L^[3]。

1 材料与amp方法

1.1 材料

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、PUC19 载体,由作者所在研究室保存。

限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、*pfu* Taq 酶、T4 连接酶、DNA clean kit 试剂盒等,购自上海华美生物公司;基因片段由上海生物工程公司合成;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 设计抗菌肽基因合成及重组质粒的构建
利用“片断拼凑”的方法,3步 PCR 扩增合成设计抗菌肽基因全长^[4],将合成基因分别克隆到载体 PUC19,构建重组质粒 PUC19-CecA/B/C/D,重组质粒转化大肠杆菌 JM109 后,得到基因工程菌 JM109-puc-CecA、CecB、CecC、CecD。工程菌 JM109-puc-CecC 质粒构建见图 1。

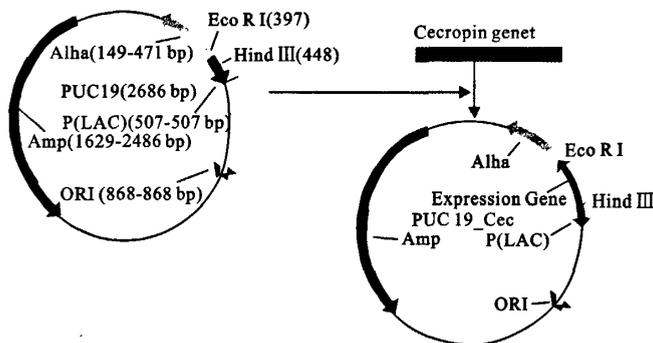


图 1 质粒构建图

Fig. 1 Vector construction chart

1.2.2 基因工程菌的诱导表达 分别挑取单菌落,接种于 3 mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。以体积分数 1% 接种于新鲜的含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 中^[5]。分别在 37 $^{\circ}$ C 和 40 $^{\circ}$ C 振荡培养,当 OD₆₀₀ 达到 0.4 左右时,添加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,继续振荡培养 6 h。

1.2.3 融合蛋白质的表达鉴定及可溶性分析 分别取未诱导菌液、诱导 4、6、8 h 的培养液各 1.5 mL,12 000 r/min 离心 10 min,将上清液和沉淀分

别进行 SDS-PAGE(15 g/dL 分离胶)分析。包涵体的鉴定用结晶紫染色法通过油镜(10 \times 100)直接观察^[6]。

1.2.4 菌体细胞的破碎 将诱导培养 8 h 的培养液取出,收集菌体。用裂解液 A(50 mmol/L Tris-HCl,5 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl)洗涤菌体 2 次后,将菌体悬浮于裂解液 A 中,冰浴中超声波处理,功率 400 W,超声波处理至悬浮液变澄清。

1.2.5 包涵体的洗涤、溶解溴化氰裂解融合蛋白质及产物纯化 破碎后工程菌悬液经 4 $^{\circ}$ C、1 500

r/min 离心 3 min, 收集上清液。将上清液继续以 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。沉淀用 2 mol/L 的尿素和溶液 B(溶液 A 加 0.5 g/dL TritonX-100)各洗涤一次。将包涵体用溶液 C(6 mol/L 盐酸胍/0.2 mol/L 盐酸)溶解, 加入 50 mg/mL 溴化氰裂解融合多肽^[7]。室温避光作用 24 h 后, 边搅拌边缓慢加入去离子水稀释, 稀释 20 倍后终止反应。用截流相对分子质量 3 000 透析袋透析, 除盐后冷冻干燥。

1.2.6 设计多肽的抗菌活性检测 采用琼脂糖扩散法。分别取 20 μ L 活化的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)与 15 mL、50 $^{\circ}$ C 左右的 0.8 g/dL 琼脂糖 LB 充分混和, 铺在培养皿底层。待冷却后放置在 37 $^{\circ}$ C 培养箱 2~3 h。取出后, 在培养基表面贴直径为 0.5 cm 左右的灭菌滤纸片, 将 5 μ L 待测样品滴加于滤纸片上, 继续 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

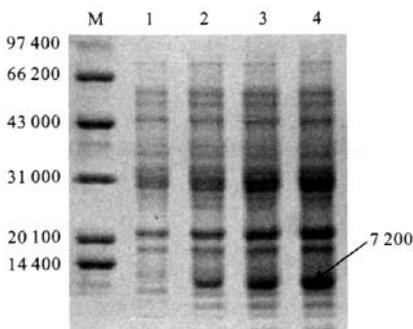
2 结果

2.1 重组质粒的构建和鉴定

PUC19 载体由 pBR322 的氨苄青霉素抗性基因、复制子及大肠杆菌 β -半乳糖苷酶 α (lacZ α) 基因融合而成。lacZ α 基因含有 lacZ 启动子、起始 ATG、核糖体结合位点。外源基因可在 lacZ 启动子的控制和 IPTG 的诱导下以 β -半乳糖苷酶融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达。转化后的重组子由上海基康生物有限公司测序。测序结果表明: 设计抗菌肽基因已经按照正确的阅读框插入载体中。

2.2 融合蛋白质的诱导表达及包涵体的鉴定

IPTG 诱导后的工程菌 JM109-PUC-Cec 经 SDS-PAGE 电泳分析发现: 在 7 000 附近出现明显新生条带, 与融合蛋白质相对分子质量一致, 见图 2。



M. 标准蛋白质, 1~4 为: 未诱导 诱导 4、6、8 h

图 2 融合蛋白质诱导表达 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE of expression of fusion protein

工程菌经超声波破碎后离心, 发现融合蛋白质在沉淀中, 由此判断融合蛋白质以包涵体形式表达。诱导后工程菌经饱和结晶紫染色后, 用显微镜也可直接观察到包涵体, 见图 3。用低相对分子质量标准蛋白质做标准曲线, 方程为 $y = -2.490 4x + 11.402$ ($R^2 = 0.988 1$), 经计算表达肽相对分子质量约 7 200, 与设计抗菌肽一致。

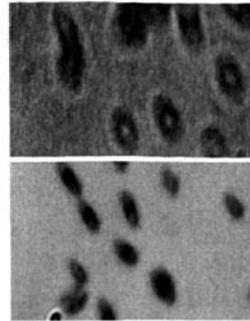
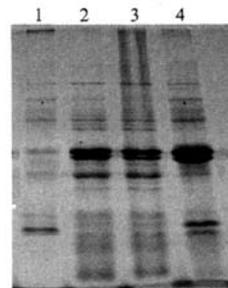


图 3 显微镜下观察包涵体

Fig. 3 Inclusion microscope

2.3 包涵体的洗涤及溴化氰切割

超声波破碎菌体细胞以后, 12 000 r/min 离心弃去上清液, 除去菌体杂蛋白质, 沉淀即为包涵体。用 2 mol/L 的尿素和溶液 B(溶液 A 加 0.5 g/dL TritonX-100)各洗涤包涵体 1 次, 除去包涵体中膜蛋白。洗涤后包涵体蛋白质基本已经较为单一, 见图 4。融合多肽经溴化氰裂解为 5 000 左右设计抗菌肽。



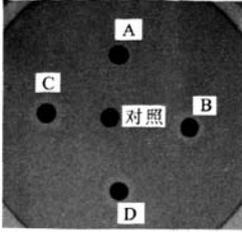
1. 包涵体洗涤后; 2, 3. 未诱导; 4. 诱导后工程菌

图 4 包涵体洗涤后 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE of inclusion washed

2.4 设计多肽的抗菌活性检测

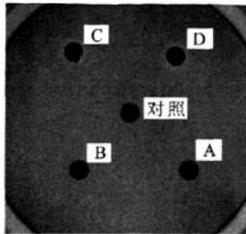
多肽裂解液透析后冷冻干燥, 将目的多肽溶解于去离子水, 质量浓度约为 5 mg/L。用琼脂糖扩散法分别检测设计多肽对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的抑菌效果, 结果发现 CecB 与 CecC 对大肠杆菌有较好的抑菌效果, 对枯草芽孢杆菌的抑制活性相对较弱, 见图 5, 6。



(A B C D 为样品 对照为 JM109-PUC19)

图5 表达多肽经裂解后对大肠杆菌抑菌圈

Fig. 5 Inhibitory zone of split peptide against *E. coli*



(A B C D 为样品 对照为 JM109-PUC19)

图6 表达多肽经裂解后对枯草芽孢杆菌抑菌圈

Fig. 6 Inhibitory zone of split peptide against *Bacillus subtilis*

3 结 语

天蚕素抗菌肽分子内不存在二硫键,肽链结构也较为简单,因此利用基因工程方法生产抗菌肽比提取天然产物要容易得多。但是抗菌肽本身对宿主菌有较强的损伤作用,所以利用原核表达时采用融合蛋白质的方式,并且通过提高发酵温度,促使表达产物形成包涵体。这样不仅可以避免表达产物对宿主菌的损伤,而且可以有效地防止表达产物被宿主细胞的蛋白酶降解。另外,包涵体比较容易纯化,只需要简单的差速离心及洗涤等几步就可以得到较高纯度的目的蛋白质^[8]。

由于载体 PUC19 并非高效的表达载体,表达量约为 0.96 mg/L,很难满足大规模制备的需要,所以进一步的研究需要更换表达载体以提高表达量。洗涤后包涵体蛋白质电泳图经图像软件 lab-swark 3.0 分析,目的蛋白质约占洗涤后包涵体总蛋白质的 40% 左右,基本可以满足活性测定的需要。

参考文献(References):

- [1] 王荫长. 昆虫生物化学[M]. 北京:中国农业出版社,2001:271-275.
- [2] 李启辉. 以天蚕素为基础的抗菌肽设计及其基因表达[D]. 无锡:江南大学,2004.
- [3] 黄自然,黄亚东,温刘发,等. 抗菌肽生物工程及其应用[J]. 蚕业科学,2005,31(4):375-381.
HUANG Zi-ran, HUANG Ya-dong, WEN Liu-fa, et al. Antimicrobial peptide biotechnology and application[J]. *Silkworm Science*, 2005, 31(4): 375-381. (in Chinese)
- [4] 韩晋辉,施用晖,吕文平,等. 多重 PCR 合成天蚕素基因及其在 *E. coli* 中的克隆[J]. 食品与生物技术, 2003, 25(4): 109-112.
HAN Jin-hui, SHI Yong-hui, LU Wen-ping, et al. Synthesis and clone of cecropins' gene in *E. coli*[J] *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2003, 25(4): 109-112. (in Chinese)
- [5] J. 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔著. 分子克隆试验手册指南(上册)[M]. 黄培堂译.(第三版)北京:科学技术出版社, 2002: 55-138.
- [6] Krueger J K, Stock A M, Schutt C E, et al. Deciphering the second half of the genetic code[M]. Washington: American Association for the Advancement of Science, 1997:136-142.
- [7] F 奥斯伯, R E 金斯顿著. 精编分子生物学实验指南[M]. 严子颖等译,北京:科学出版社,1999:644-645.
- [8] Yang Y H, Zheng G G, Wu K F, et al. Expression of bioactive recombinant GSLL239, a variant of human antimicrobial peptide LL237, in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expr Purif*, 2004, 37 (1): 229-235.

(责任编辑:李春丽)