

多肽抗生素 apidaecin 基因在乳酸乳球菌中的融合表达

孙 超 陈秀珠 还连栋 彭学贤*

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘 要 利用乳链菌肽(nisin)诱导表达系统,以泛素(ubiquitin)融合蛋白的形式在乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)中表达了多肽抗生素 apidaecin。利用 Tricine-SDS-PAGE 和 Western blotting 均可在诱导后的宿主菌中检测到特异蛋白带。表达产物的最高产量可达宿主菌可溶性蛋白的 7.2% 左右。在体外用泛素特异性蛋白酶 UBPI 从融合蛋白中切除泛素后,产物具有明显的抗菌活性。

关键词 多肽抗生素, apidaecin, 乳酸乳球菌, 乳链菌肽, 泛素

中图分类号 Q978.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0020-04

多肽抗生素一般是指分子量在 10 kD 以下,具有抗菌活性的小肽。多肽抗生素除了具有抗菌或真菌作用外,有些还具有抗原虫、病毒、癌细胞的功能,因此可以用于多种临床疾病的治疗^[1]。apidaecins 是一类来源于膜翅目昆虫的富含脯氨酸的多肽抗生素,一般含有 16~18 个氨基酸残基^[2]。apidaecins 对多种革兰氏阴性菌具有很强的杀伤力,而通常对包括乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)在内的革兰氏阳性菌不起作用。由于 apidaecins 对多种植物病原菌、人类致病菌具有很强的杀伤作用,因此在植物抗细菌病基因工程、食品添加剂和医药工业上有着广阔的应用前景。

乳链菌肽诱导表达系统是最近发展起来的一种乳酸乳球菌的高效表达系统^[3]。nisinA 可以诱导其自身启动子进行转录,诱导效率在 1000 倍以上。调节因子 nisinK 和 nisinR 是诱导过程中信号传导所必需的。利用 nisinA 启动子和 nisK、nisR 基因构建的一系列表达载体和相应的宿主菌,1996 年起开始用于目的基因的表达研究。由于乳链菌肽诱导表达系统的诱导物和宿主菌都是食品级的,因此利用该系统表达具有临床应用价值的多肽或蛋白,可以有效地提高基因工程产品的安全性,并在一定程度上简化表达产物的后处理工艺。

我们利用乳链菌肽诱导表达系统在乳酸乳球菌中成功表达了 18 肽 apidaecin 和泛素的融合蛋白,经泛素特异性蛋白酶 UBPI 水解后,得到了具有抗菌活性的产物。在乳酸乳球菌中表达具有生物活性

的小肽物质,在国内外尚属首次,为基因工程方法生产多肽抗生素和其它生物活性小肽开辟了新路。

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

植物病原细菌 *Agrobacterium tumefaciens* 0006, *Erwinia herbicola* 0082 由北京市动植物检疫所张乐教授惠赠,质粒 pKSubiU₄ 由法国 Louis Pasteur 大学的 Fleck 教授惠赠,其中含有 polyubiquitin 基因。质粒 pJT148 中含有泛素特异性蛋白酶 UBPI 基因,由美国麻省理工学院的 Varshavsky 教授惠赠。表达载体 pNZ8040 及其宿主菌—*L. lactis* NZ9000 购自荷兰 NIZO 研究所。pNZ8040 是一个具有广泛宿主范围的载体,可在乳酸乳球菌和大肠杆菌中复制。pNZ8040 带有氯霉素(Cm)抗性筛选标记。*L. lactis* NZ9000 由泛素缺陷型菌株 MG1363 衍生而来,其染色体上整合有 nisK 和 nisR 基因。*E. coli* MC1061 用于载体的克隆和构建,在 LB 培养基上 37℃ 培养。*L. lactis* NZ9000 用于融合蛋白的诱导表达,在含 0.5% 葡萄糖的 M₁₇ 培养基^[4](GM₁₇)上 30℃ 培养。*L. lactis* 的质粒提取参见文献[5],电击转化按照 Wells 等人^[6]的方法进行。当用抗生素筛选克隆时,Cm 的终浓度对于 *E. coli* 为 25 μg/mL,对 *L. lactis* 为 5 μg/mL。

1.2 多肽的合成及抗体的制备

多肽抗生素 apidaecinHbI 由美国 CyderSyn 公司利用固相多肽合成法合成。其氨基酸序列如下:

GNNRPVYIPOP RP PPHRL。抗体的制备参照 Cas-teels 等人的方法^[2]进行。所得兔血清的 Dot ELISA 滴度在 5000 以上。

1.3 融合表达载体的构建

根据 Fleck 教授提供的 polyubiquitin 基因的序列,合成了泛素基因的上游引物:5' cagatcttcgttaaac 3'和下游引物:5' atgaattcgctccgcggagacgaagcacc-aag 3'。利用 PCR 的方法从质粒 pKSubiU₄ 中扩增出泛素的单体基因,并在其 3'末端依次引入了 SacII 和 EcoRI 位点,PCR 条件如下:94℃变性 30s,45℃退火 1min,72℃延伸 30s。利用限制酶 NcoI 酶切 *L. lactis* 的表达载体 pNZ8040,然后用 T4 聚合酶补平,再用 EcoRI 酶切,回收 3.5kb 片段。扩增出的泛素单基因片段经 T4 聚合酶处理后,再用 EcoRI 酶切,然后与上述 3.5kb 的载体片段连接,得到中间载体 pNZUbi40。

根据 apidaecinHbI 的氨基酸序列,按照原核生物偏嗜密码子人工合成了 apidaecinHbI 基因的两条链:编码链:5' ggtggtggaacaaccgtccggtttacatcccgcga-gc-cgcgtccgcgcaccgcgctgttagtaag 3'

模板链:5' aattcttactacagacgcgggtgcggcggacgcg-gct-gcgggatgtaaaccggacggtgttaccaccaccgc 3'

退火后获得 apidaecinHbI 基因在其 5'末端和 3'末端分别带有 SacII 和 EcoRI 的粘性末端,将 apidaecin HbI 基因与经 SacII 和 EcoRI 酶切的 pNZUbi40 相连,得到含有泛素和 apidaecinHbI 融合基因的表达载体 pNZUHb40。以上构建是在 *E. coli* MC101 中完成的。融合基因的序列通过测序证明完全正确后,从大肠杆菌中提取质粒 pNZUHb40,用电击转化的方法转化 *L. lactis* NZ9000,PCR 法挑选阳性克隆。

1.4 融合蛋白在乳酸乳球菌中的诱导表达及产物的酶解

融合蛋白在乳酸乳球菌中的诱导表达按照 de Ruyter 等人^[3]的方法进行,诱导物 nisinA 在培养基中的终浓度为 5ng/mL。诱导后离心回收菌体,用去离子水洗涤 2 次,超声波破碎菌体,离心除去细胞碎片,收集上清液备用。上清液可用电泳的上样缓冲液处理,直接用于电泳。产物的酶解参照文献[7]进行。将含有质粒 pJT184 的 *E. coli* BL21 培养至 OD_{600} 约为 1.0,离心收集菌体,去离子水洗涤 2 次,超声波破碎,离心收集上清液,与乳酸乳球菌破碎后的上清液等体积混合,36℃温育 2h,沸水浴 5min 灭活蛋白酶。

1.5 Tricine-SDS-PAGE 电泳及 Western blot 检测

Tricine-SDS-PAGE 小分子量变性电泳参照 Schagger 等人^[8]的方法进行,利用半干转膜仪进行转膜,Western blot 按照 Too 等人^[9]的方法进行。

1.6 抑制菌活性检测

参照 Hultmark 等^[10]的固体平板抑菌圈法,略作改动。以 *E. coli* BL21, *Agrobacterium tumefaciens* 0006, *Erwinia herbicola* 0082 作为供试菌株。将大肠杆菌培养至 OD_{600} 约为 0.5 左右,取 100μL 菌液与 100mL 含 1% 琼脂的 NA 培养基在 45~55℃间混合后铺平板。待培养基凝固后,将牛津小杯轻轻放在培养基表面,每个小杯内加入 300μL 待测样品,37℃培养过夜,观察抑菌圈大小。

2 结果与分析

2.1 乳酸乳球菌融合表达载体的构建

由于设计了合适的泛素基因的 5'引物,使 PCR 产物从表达载体 pNZ8040 补平的 NcoI 位点插入后,不会产生移码突变,同时保证起始密码子 ATG 到核糖体结合位点(RBS)的距离不变,使其具有最大的转录起始效率。利用密码子的简并性,通过同义突变,在不改变氨基酸顺序的情况下,在泛素基因的 3'端引入 SacII 位点,以利于其它基因与泛素基因的融合。

合理设计 apidaecin 基因,在不发生移码突变和在泛素和 apidaecin 间不增加多余的氨基酸的情况下,通过 SacII 位点将 apidaecin 基因与经 SacII 和 EcoRI 酶切的中间载体连接,得到含有泛素和 apidaecin 融合基因的表达载体 pNZUHb40。在 apidaecin 基因 3'端设计了 2 个终止密码子 TAG 和 TAA,以增加翻译的终止效率。在翻译终止密码子后还保留了载体上 pepN 基因的 3'端的一部分及其转录终止子。一方面可以通过增加 mRNA 的长度提高其稳定性,另一方面 pepN 转录终止子是一个很强的转录终止信号,可以防止转录进入复制子区而降低载体和外源片段的稳定性^[11]。

2.2 电泳及 Western blot 检测结果

阳性克隆进行诱导表达后,对表达产物进行变性凝胶电泳分析。结果见图 1。诱导后的菌株破碎液在 10 kD 左右有一条特异的蛋白带,分子量与 ubiquitin-apidaecin 融合蛋白的理论计算值相符。蛋白胶扫描显示该特异带约占宿主菌可溶性蛋白的 7.2%(扫描图谱略)。将诱导后的菌体破碎液与含泛素特异蛋白酶(BP1)的大肠杆菌菌体破碎液等体

积混合,酶解融合蛋白。对酶解前后的破碎液进行 Western blot 检测,结果见图 2。在 10kD 处的蛋白带可以和 apidaecin 的抗血清反应,进一步证明了该产物是 ubiquitin-apidaecin 融合蛋白。因为乳链菌肽诱导表达系统的严谨性很高,本底表达水平很低,所以在诱导前的破碎液中没有检测到融合蛋白。用 UBPI 酶解后,在 2kD 左右出现一条特异带,与 apidaecin 的阳性对照位置一致,说明 UBPI 在正确的位置将融合蛋白切开产生了多肽抗生素 apidaecin。

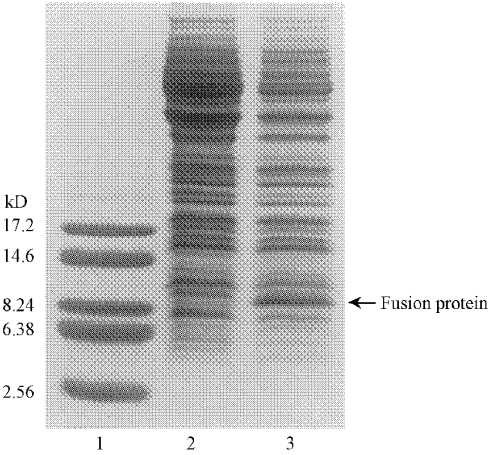


图 1 表达产物的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig. 1 Tricine-SDS-PAGE analysis of the expression product

1. Low molecular weight markers ; 2. The lysate of non-induced cells ; 3. The lysate of induced cells.

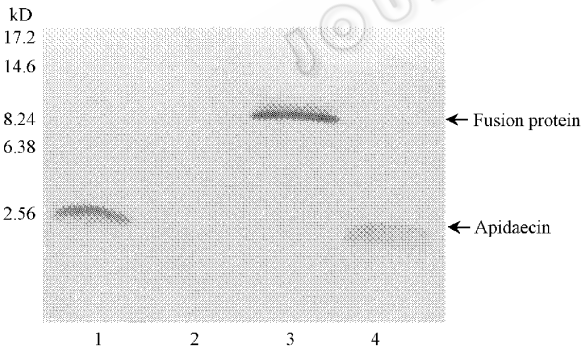


图 2 表达产物及其 UBPI 酶解产物的 Western blot 分析

Fig. 2 Western blot analysis of the expression product and its hydrolysate by UBPI

1. Apidaecin standard ; 2. The lysate of non-induced cells ; 3. The lysate of induced cells ; 4. The lysate of induced cells + UBPI

2.3 抑菌活性检测结果

以 *E. coli* BL21 作测试菌株的抑菌实验结果见图 3,诱导表达的乳酸乳球菌裂解液与灭活的 UBPI 保温没有抑菌现象,说明融合蛋白几乎没有抑菌活性,而融合蛋白酶解后的产物和 apiolaecin 纯品一样显示出明显的抑菌效果。用植物病原细菌作测试菌

株进行抑菌活性检测,得到了相同的结果(照片略)。从上述载体构建,Western blot 及抑菌实验结果可以证明,诱导表达的融合蛋白,经泛素特异性蛋白酶水解后,可以产生具有正确氨基酸序列的 apidaecin,并可形成正确的高级结构,因而具有明显的抑菌活性。

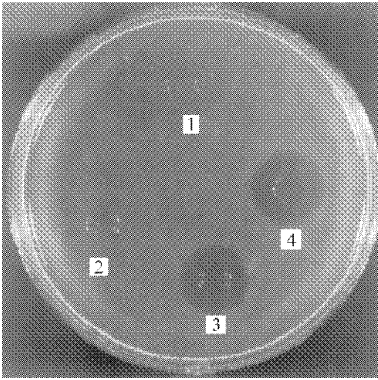


图 3 表达产物及其 UBPI 酶解产物的抑菌活性

Fig. 3 Antibacterial activity of the expression product and its hydrolysate by UBPI

1. The lysate of non-induced cells + USP1 ; 2. The lysate of induced cells + boiled UBPI ; 3. The lysate of induced cells + UBPI ; 4. Apidaecin standard

3 讨 论

由于 apidaecin 在医药工业和转基因植物抗病等方面的应用潜力,我们在乳酸乳球菌的乳链菌肽诱导表达系统中对其进行了融合表达。该诱导表达系统具有以下优点:食品级的诱导物和宿主菌,严谨性高,本底表达水平低,诱导效率高,表达产量高。此外,由于 apidaecin 对乳酸乳球菌没有杀伤作用,宿主菌 *L. lactis* NZ9000 中检测不到蛋白酶活性,所以该系统更适合于小肽 apidaecin 的表达。

为了进一步增加表达过程中在 mRNA 和蛋白水平上的稳定性,我们在 apidaecin 基因前面融合上了泛素基因。泛素可以以分子内伴侣的形式起到增加翻译水平和稳定蛋白的作用^[12]。泛素特异性蛋白酶 1(UBPI)来源于酵母,可以有效地酶解泛素融合蛋白^[7]。与其他用于酶解融合蛋白的特异性蛋白酶如 FactorX 和 Thrombin 相比,UBPI 具有酶活性高,特异性强的优点。所以泛素融合表达系统越来越受到了人们的青睐。

病原菌对常规抗生素的抗药性已经越来越严重地威胁到人类的健康,而缺乏新型的抗生素是病原菌抗药性发展的一个重要原因。多肽抗生素因为种类多,可选择范围广,抗菌活性高,抗菌谱广及不易

产生抗性突变等原因,而成为开发新型抗生素的首选目标^[13]。但是多肽抗生素的合成问题一直是制约多肽抗生素研究和工业化生产的瓶颈。目前多肽抗生素的合成多采用固相合成的方法,但是成本过于昂贵。因此人们希望用基因重组技术来生产多肽抗生素,一方面可以降低成本,另一方面可以利用基因突变的方法对多肽抗生素的结构和功能进行研究。apidaecins 的杀菌过程需要经过一个手性识别的阶段,这与目前大多数抗菌肽通过双亲结构裂解细胞膜的杀菌机理完全不同^[14]。因此对 apidaecin 的作用机理的研究有可能揭示出一种全新的杀菌机制,具有很高的理论意义。多肽抗生素 apidaecin-HbI 基因在乳酸乳球菌中的成功表达,为 apidaecin-HbI 的工业应用和进一步了解其性质及作用机理奠定了基础,也为利用基因工程方法,在乳酸乳球菌这种食品级微生物中生产生物活性小肽探索出了一条新路。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Andreu D ,Rivas L. Animal antimicrobial peptides :an overview. *Biopolymers* ,1998 **47** :415~433
- [2] Casteels P ,Romagnolo J ,Castle M *et al.* Biodiversity of apidaecin-type peptide antibiotics. *J Biol Chem* ,1994 **269** :26107~26115
- [3] de Ruyter P G G A ,Kuipers O P ,de Vos W M. Contolled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol* ,1996 **62** :3662~3667
- [4] Terzaghi P E ,Sandine W E. improved medium for lactis strepto-

cocci and their bacteriophages. *Appl Microbiol* ,1975 **29** :807~813

- [5] Vos P ,Wan Asseldonk M ,wan Jeveren F *et al.* A maturation protein is essential for production of active forms of SK11 serine proteinase located in or secreted from the cell envelope. *J Bacteriol* ,1989 **171** :2795~2802
- [6] Wells J M ,Wllson P W ,le Page R W F. improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*. *J Appl Bacteriol* ,1993 **74** :629~636
- [7] Tobias J W ,Varshavsky A. Cloning and functional analysis of the ubiquitin-specific protease gene UBPI of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* ,1991 **266** :12021~12028
- [8] Schägger H ,Von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* ,1987 **166** :368~379
- [9] Too C K L ,Murphy P R ,Croll R P. Western blotting of formaldehyde-fixed neuropeptides as small as 400 daltons on gelatin-coated nitrocellulose paper. *Anal Biochem* ,1994 **219** :341~348
- [10] Hultmark D ,Engström Å ,Andersson K *et al.* Insect immunity. Attacins a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J* ,1983 **2** :571~576
- [11] Platteuw C ,van Alen-Boerrigter I ,van Schalkwijk S *et al.* Food-Grade Cloning and expression system for *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* ,1996 **62** :1008~1013
- [12] Baker R T. Protein expression using ubiquitin fusion and cleavage. *Curr Opo in Biotechnol* ,1996 **7** :541~546
- [13] Hancock P E W. Peptide antibiotics. *Lancet* ,1997 **349** :418~422
- [14] Casteels P ,Tempst P. Apidaecin-type peptide antibiotic function through a non-poreforming mechanism involving stereospecificity. *Biochem Biophys Res Commun* ,1994 **199** :339~345

Fusion Expression of a Peptide Antibiotic—apidaecin Gene in *Lactococcus lactis*

SUN Chao CHEN Xiu-Zhu HUAN Lian-Dong PENG Xue-Xian*

(Institute of Microbiology ,Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080 ,China)

Abstract The ubiquitin fusion of apidaecin was expressed in *Lactococcus lactis* ,using a novel nisin-inducible expression system. After induction ,a specific band could be detected in the extracts of the host strain by Tricine-SDS-PAGE and Western blotting. Production of the fusion was up to 7.2% of the total soluble protein of the host strain. While the fusion was cut by ubiquitin specific protease-UBPI ,the product had distinct antibacterial activity.

Key words peptide antibiotic , apidaecin , *Lactococcus lactis* , nisin , ubiquitin

Received June 29 2000

* Corresponding author. Tel 86-10-62522107 ; Fax 86-10-62560912 ; E-mail pengxx@sun. im. ac. cn

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