

家蚕抗菌肽-死亡素杂合肽基因在大肠杆菌中的克隆与表达

翁宏飏^{1,2*} 牛宝龙² 孟智启² 徐孟奎¹

¹(浙江大学动物科学学院 杭州 310029)

²(浙江省农业科学院蚕桑研究所 杭州 310021)

关键词 抗菌肽, Cec B-Tan 基因, 融合表达, 抗菌活性, 杂合肽

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)03-0352-04

近年来的研究发现, 抗菌蛋白在生物体非专一性防御系统有着重要的作用, 已有数十种具有抗菌活性的多肽被分离, 这些多肽可大致分为 3 类, 即含分子内二硫桥的抗菌肽; 具有双亲 α -螺旋结构的抗菌肽, 以及富含某种氨基酸残基的抗菌肽^[1], 一般来说, 这些抗菌肽具有分子量小, 稳定性好, 无细胞毒性, 抗菌谱广等特点。多种抗菌肽的一级结构和二级结构已经确定^[2], 但作用机理仍不明了。一般认为可能存在两种作用模式, 即 1) 通过肽-脂膜相关作用杀菌, 2) 通过受体介导的识别过程起作用^[1]。

Cecropin B 是一种较早从家蚕中分离得到, 由 35 个氨基酸残基组成的抗菌肽^[3,4]。研究认为, Cecropin B 可以在疏水环境中形成螺旋-卷曲-螺旋的结构^[5]。Cecropin B 是通过在细胞膜上作用造成孔洞, 使细胞内容物外溢而造成细胞死亡, N 端序列对于其活性具有重要作用^[5-7]。死亡素(Thanatin)是近来发现抗菌谱最广的抗菌蛋白, 它不仅对革兰氏阳性、革兰氏阴性菌有抗性, 而且对真菌也有杀灭活性, 其作用方式可能是阻断细胞膜上的呼吸链^[8]。Thanatin 含 2 个 Cys 残基, 可形成分子内的二硫桥, 溶液中的 Thanatin 的核磁共振及分子动力学模拟研究表明: Thanatin 分子内有 4 个区域与其活性密切相关^[1,8-10]。

本文取天然蚕抗菌肽 Cecropin B 的 N 端双亲 α -螺旋及链接区的 24 个氨基酸即 Cecropin(1-24) 作为杂合肽 N 端, 取 Thanatin 的后 17 个氨基酸即 Thanatin(4-21) 作为杂合肽的 C 端, 中间以 Arg-Ser-Tyr 连接。利用 EMBL 的 "The predictprotein serve" 进行预测。将杂合肽基因在大肠杆菌中进行诱导表达, 并初步研究了该杂合肽的抗菌活性。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 TG1, BL21 及质粒 pGEX-Cec B, pGEX-Tan 为本实验室保存; Taq DNA 聚合酶 TaKaRa 公司产品; 肠激酶和

IPTG 购自 Sigma, 特异引物由上海生工生物工程公司合成; GST 亲和纯化柱为 Pharmacia Biotech 公司产品; 中分子量及低分子量蛋白 Marker 分别购自上海博亚生物技术有限公司和上海生工生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 融合表达质粒的构建: 用引物 A: 5' GGGC-CCAAGATCTTACCCAGTCCCAATC 3' 和引物 B: 5' GAATTCCTA-CATCCTCTGGCA 3' 以质粒 pGEX-Tan 为模板进行 PCR, 回收 76 bp 的特异片段, 用 *Apa* I 和 *Eco* R I 酶解。质粒 pGEX-Cec B 用 *Apa* I 和 *Eco* R I 酶切开, 将酶解后的特异片段插入到 pGEX-Cec B 中, 得到质粒 pGEX-Cec B-Tan。

1.2.2 重组、克隆和 DNA 序列分析: 质粒制备、限制酶酶解、低熔点琼脂糖凝胶电泳、DNA 片段回收和纯化、片段连接、大肠杆菌转化等参照文献 [11] 进行。DNA 序列委托 TaKaRa 公司测定。

1.2.3 融合蛋白的表达^[11]: 挑选新转化含有重组质粒的 BL21 菌, 37°C 培养过夜, 次日再按 1:50 比例转入含有 25 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37°C 振荡 2h 后加入 IPTG (终浓度为 0.2 mol/L) 诱导, 4h 后收集菌体, 超声破碎, 离心取上清液。

1.2.4 亲和层析纯化融合蛋白: 按 Pharmacia Biotech 公司产品说明书进行, 对 Glutathione Sepharose 4B 预装柱以 10~20 mL PBS (150 mol/L NaCl, 16 mol/L Na₂HPO₄, 4 mol/L NaH₂PO₄, pH 7.3) 洗柱后, 用 6 mL PBS + 1% Triton X-100 平衡, 取适量样品上柱, 以 2 \times 10 mL PBS 洗至基线, 最后以洗脱缓冲液 (5 mol/L Glutathione, 50 mol/L Tris-HCl pH 8.0) 洗脱, 收集洗脱峰。

1.2.5 SDS-PAGE^[11]: 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 12%。

1.2.6 蛋白浓度测定: 以 BSA 作标准蛋白, 按 CBB 法^[12] 测定样品蛋白浓度。分别取 5.0、10、15、20、25 μ g 标准蛋白, 绘

制 595nm 的标准曲线。取 10 倍稀释的亲亲和层析纯化产物 10 μ L 补水至 0.5mL, 加入 3.0mL 染色液, 摇匀, 于室温放置 3~5min, 测定 595nm 吸收值, 计算样品浓度。

1.2.7 肠激酶裂解融合蛋白^[11] 取浓度为 1mg/mL 的融合蛋白 5mL, 加入 50u 肠激酶, 35 $^{\circ}$ C 温育 16h, 加入终浓度为 2 mmol/L 的 DMSF 终止反应。

1.2.8 Tricine-SDS-PAGE^[13] 取裂解产物 10 μ L 加入等体积 2 \times SDS 凝胶上样缓冲液进行电泳。浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 16%。

1.2.9 生物活性检测 取 1mL 新鲜培养的对数生长期细菌

BL21, 用 LB 稀释 OD_{650} 至 0.3, 取 10 μ L 菌液, 分别加入 0、20、40、60、80、100、120、140 μ L 肠激酶反应液, 补 LB 至 200 μ L, 37 $^{\circ}$ C 培养 3.5h, 测定 OD_{650} 细菌浓度。

2 结果与分析

2.1 融合表达载体的构建与筛选

质粒 pGEX-Cec B 和 PCR 扩增的特异片段分别用 *Apa* I 和 *Eco* R I 酶切, 然后连接得到质粒 pGEX-Cec B-Tan, 转化 TG1, PCR 筛选阳性克隆, 测序结果正确 (图 1)。

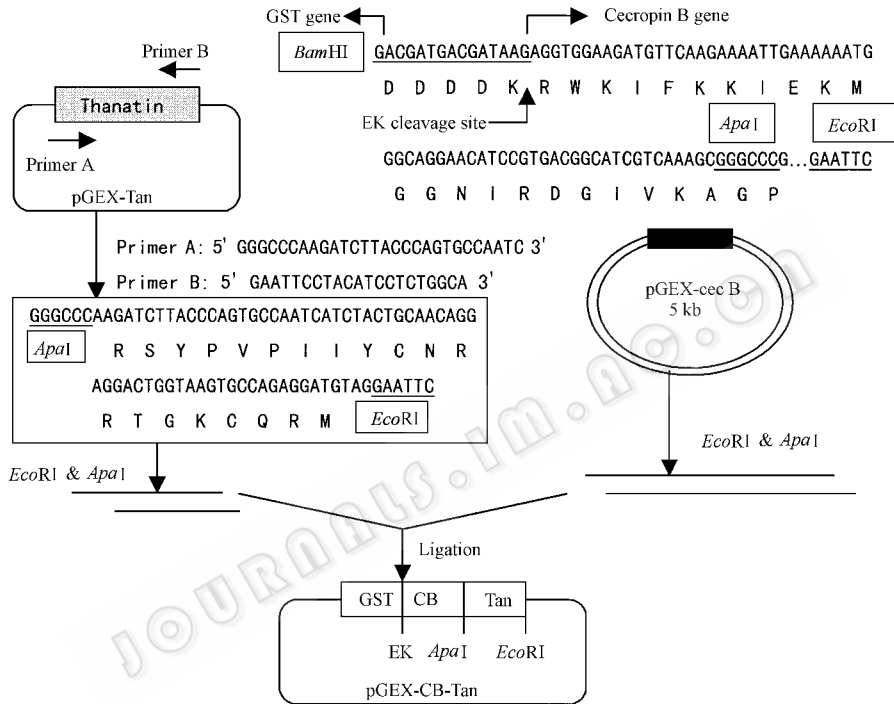


图 1 杂合肽 CB-Tan 基因融合表达质粒的构建

Fig. 1 Construction of hybrid peptide CB-Tan fusion expression vector

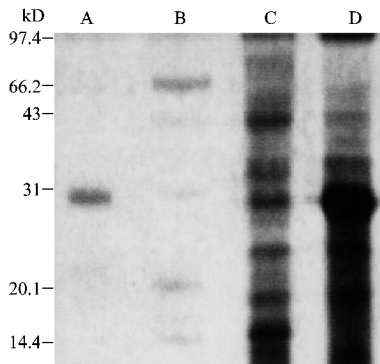


图 2 融合蛋白的表达及亲和纯化产物电泳分析

Fig. 2 SDS-PAGE of fusion protein

A. Affinity chromatography; B. Protein weight marker (97, 66.2, 43, 31, 20.1, 14.4kD); C. *E. coli* BL21 without pGEX-CB-Tan after induction; D. *E. coli* BL21 with pGEX-CB-Tan after induction

2.2 表达产物的电泳

将 pGEX-Cec B-Tan 转化 BL21, IPTG 诱导表达后, 收集菌体, 超声破菌。经 12% SDS-PAGE 银染, 在 29kD 处多出一条明显条带 (图 2)。凝胶扫描显示融合蛋白约占总蛋白的 25%。

2.3 融合蛋白的分离纯化

将诱导后的 BL21 经 PBS 悬浮, 超声破菌后加入终浓度为 1% 的 Triton X-100, 摇匀后上亲和柱, 用洗脱缓冲液 (5mol/L Glutathione, 50mol/L Tris-HCl pH 8.0) 洗脱, 洗脱物经 12% SDS-PAGE 银染, 在 29kD 处有一蛋白条带 (图 2)。

2.4 融合蛋白的切割和切割后产物的活性检测

经肠激酶处理后, 融合蛋白被部分酶切, 在 26kD 和 3.5kD 处出现 2 条新的蛋白带。另外还有 2 条来源于肠激酶, 分子量分别为 14kD 和 10kD 的蛋白 (图 3)。

将细菌与不同量的肠激酶酶切产物共育 3.5h 后, 对照 (0 μ L) 及 20 μ L、40 μ L 处理区细菌浓度较高 (OD_{650} < 0.75), 而

Thanatin 的 $60\mu\text{L}$ 处理区,细菌生长被部分抑制($OD_{650} \approx 0.32$),而 $80\mu\text{L}$ 及以上处理区,细菌不能生长($OD_{650} < 0.01$),而 Cecropin B 和 Cec B-Tan 的 $80\mu\text{L}$ 处理区,有少量细菌生长($OD_{650} \approx 0.24$), $100\mu\text{L}$ 及以上处理区,细菌不能生长($OD_{650} < 0.01$) (图 4)。

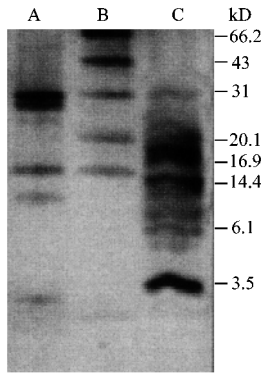


图 3 杂合肽 CB-Tan 酶切产物电泳分析

Fig.3 Tricine-SDS-PAGE of hybrid peptide

A. Fusion protein digested with enterokinase; B. Protein marker 1 (97, 66.2, 43, 31, 20.1, 14.4kD); C. Protein marker 2 (31, 20.4/19.7, 16.9, 14.4, 6.1, 3.5kD)

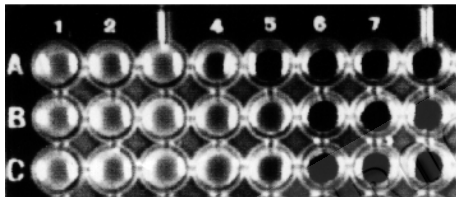


图 4 抑菌实验

Fig.4 Antibacterial activity assay

Growth inhibition of *E. coli* BL21 was assayed by incubating serial EK digestion products with $10\mu\text{L}$ $0.3 OD_{650}$ bacteria at 37°C for 3.5h

A. Thanatin; B. Cec B-Tan hybrid peptide; C. Cecropin B; 1~8. $0\mu\text{L}$, $20\mu\text{L}$, $40\mu\text{L}$, $60\mu\text{L}$, $80\mu\text{L}$, $100\mu\text{L}$, $120\mu\text{L}$, $140\mu\text{L}$ of EK digestion products

3 讨 论

对蛋白质结构的深入了解以及结构与功能关系的研究,为抗菌肽的分子改造与设计提供了理论依据。目前,抗菌肽分子设计主要有:改变抗菌肽两性分子 α -螺旋的氨基酸的组成,增强其螺旋度,即可能获得活性更高,抗菌谱更广的抗菌肽^[14-16]。另外,将结构、功能不同或相关的蛋白及多肽合而为一而产生杂合蛋白的研究开发,国内外也有报道^[17-19]。抗菌肽分子的改造与设计已经成为获得新抗菌肽的重要途径。

本研究在构建 Cec-Tan 杂合肽基因时,将 Cec B N 端的两亲 α -螺旋域,通过绞链区连接到 Thanatin 的 N 端,保持 Thanatin 的 β -sheet、分子内二硫桥以及 C 端 3 个延伸残基等功能结构,通过提高其与生物膜的作用,以期获得高抗菌活性的抗菌肽。所构建的原核重组表达载体,转化大肠杆菌后,经

IPTG 诱导,得到理想的表达。表达产物经 GST 亲和纯化获得较纯的融合蛋白,用肠激酶酶切融合蛋白即可得到具有抗菌活性的杂合肽。由于所用的肠激酶不是工程酶,含有杂蛋白成分,给酶切产物的纯化带来困难。本文只对 Cec B-Tan 杂合肽进行了初步的生物活性检测,杂合肽的纯化、杀菌效价及抗菌谱分析工作正在进行,结果另文发表。

本实验在浙江省农业科学院蚕桑研究所昆虫发育生物学实验室完成。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Bulet P, Hetru C, Dimarcq J-L, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology*, 1999, **23**: 329 ~ 344
- [2] Boman H G, Faye I, Hofsten V P *et al.* On the primary structures of lysozyme, cecropins and attacins from *hyalophora cecropia*. *Developmental and Comparative Immunology*, 1985, **9**: 551 ~ 558
- [3] QU X M (屈贤铭), WU K Z (吴克佐), QIU X Z (邱雪贞) *et al.* Isolation and Identification on six antibacterial peptides from the hemolymph of immunized *Bombyx mori* pupae by injection of poly I : C. *Acta of Biochem and Biophy* (生物化学与生物物理学报), 1986, **18**(3): 284 ~ 291
- [4] Yamano Kato, Tanai K, Hirochika H, Yamakawa M. Expression and characterization of cDNAs for cecropinb, an antibacterial protein of the silkworm, *Bombyx Mori*. *Insect Biochem Molec Biol*, 1993, **3**(2): 285 ~ 290
- [5] Gazit E, Lee W J, Brey P T *et al.* Mode of action of the antibacterial cecropin B 2: a sepectrofluorometric study. *Biochemistry*, 1994, **33**: 10681 ~ 10692
- [6] Andreu D, Merrifield R B, Steiner H *et al.* N-terminal analogs of cecropin A: synthesis, antibacterial activity and conformational properties. *Biochem*, 1985, **24**: 1683 ~ 1688
- [7] DOU K (窦非), XIE W (谢维), DONG X Y (董雪吟) *et al.* Relationship of bioactivity and terminal structure of antibacterial peptide CMIV. *Science in China* (中国科学), 2000, **30**(1): 59 ~ 64
- [8] Fehlbaum P, Bulet P, Chernyds S, Briand J P *et al.* Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 1221 ~ 1225
- [9] Mandart N, Sodano P, Labbe H *et al.* Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensional nuclear magnetic resonance data. *European Journal of Biochemistry*, 1998, **256**(2): 404 ~ 410
- [10] Taguchi S, KDasako K, Suenaga A *et al.* Functional mapping against *Escherichia coli* for the broad-spectrum antimicrobial peptide, thanatin, based on an *in vivo* monitoring assay system. *J Biochem*, 2000, **128**: 745 ~ 754
- [11] Ausubel F M, Roger Brent, Robert E Kingston *et al.* Short protocols in molecular biology. 3rd ed. John Wiley & Sons Inc, 1995
- [12] LI J (李娟), ZHANG Y T (张耀庭), ZENG W (曾伟) *et al.* The coomassie blue method of protein quantitation. *Chin J Biologicals* (中国生物制品学杂志), 2000, **13**(1): 118 ~ 120

- [13] Schagger H , Von Jagow G . Tricine-sodium decyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kD . *Analytical Biochemistry* , 1987 , **166** : 368
- [14] Boman H G , Faye I , Gudmundsson G H *et al.* Cell-free imol/Lunity in cecropin : a model system for antibacterial protein . *Eur J Biochem* , 1991 , **201** : 23 ~ 31
- [15] Iwahori A . Synthesis of reversed magainin 2 analogs enhanced antibacterial activity . *Biol Pharm Bull* , 1997 , **20**(3) : 267 ~ 270
- [16] JIA S R (贾士荣) QU X M (屈贤铭) . Application of antibacterial polypeptides in potato genetic engineering (马铃薯抗菌肽基因工程) . Beijing : Chinese agricultural science & technology Press , 1996
- [17] HUANG Y (黄音) , LIU F F (刘飞鹏) , ZHOU T H (周天鸿) *et al.* Cloning and expression of a synthetic gene encoding Magainin-Melittin hybrid peptide in *Escherichia coli* and studies on its antibacterial activity . *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) , 2001 , **17**(2) : 207 ~ 210
- [18] Song Yub Shin , Joo Hyun Kang , So Yun Jang *et al.* Effects of the hinge region of cecropin A(1-8)-magainin X(1-12) , a synthetic antimicrobial peptide , on liposomes , bacterial and tumor cells . *Biochimica Biophysica Acta* , 2000 , **1463** : 209 ~ 218
- [19] Shin S Y , Lee M K , Kim K L , Hahn K S . Structure-antitumor and hemolytic activity relationships of synthetic peptides derived from cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides . *J Protein Chem* , 1999 , **50**(4) : 279 ~ 285

Cloning and Expression of the Cecropin B-thanatin Hybrid Antimicrobial Peptide in *Escherichia coli*

WENG Hong-Biao^{1,2*} NIU Bao-Long² MENG Zhi-Qi² XU Meng-Kui¹

¹(College of Animal Sciences , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China)

²(Institute of Sericultural Sciences , Zhejiang Academy of Agricultural Sciences , Hangzhou 310021 , China)

Abstract A 44-residue hybrid peptide (CB(1-24)-Arg-Ser-Tyr-Tan(4-21)) incorporating 1-24 residues of cecropin B(CB) and 4-21 residues of thanatin(Tan) was designed and constructed . The CB-Tan gene was cloned into expression plasmid pGEX-3X and expressed in *E. coli* BL21 . The fusion protein was purified by affinity chromatography . After digested with enterokinase the gene product released with antibacterial activity and gave one band in Tricine-SDS-PAGE .

Key words cecropin B , thanatin , hybrid peptide , fusion expression

Received : 11-09-2001

This work was supported by Key Research Program of Zhejiang Province (No. 2002C22019) .

* Corresponding author . Tel : 86-571-86404173 ; Fax : 86-571-86404298 ; E-mail : cswswjz@zaas.org

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