

简报 Short Communications

死亡肽基因的合成及在大肠杆菌中的表达

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)

摘要: 将人工合成的寡核苷酸片段, 通过 PCR 扩增得到死亡肽 (thanatin) 基因, 并将其克隆到表达载体 pGEX-3X 中, 序列分析结果正确。经 IPTG 诱导, 在大肠杆菌 BL21 中进行高效可溶性表达, 表达量可达 20% 以上。融合蛋白通过 GST 亲和层析纯化, 用肠激酶酶解表达产物, 用 Sephadex G-25 初步纯化得到具有抗菌活性的死亡肽。

关键词: 死亡肽; 融合表达; 大肠杆菌

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296 (2003) 01-0114-04

Cloning and fusion expression of the antimicrobial peptide thanatin gene in *Escherichia coli*

WENG Hong-Biao^{1, 2}, NIU Bao-Long², MENG Zhi-Qi^{2*}, 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: The thanatin gene was obtained and inserted into expression vector pGEX-3X by a DNA recombinant method which was checked by nucleotide sequencing. The fusion protein of GST-thanatin was produced by IPTG induction in *Escherichia coli* (BL21). The expression level was about 20%. The fusion protein was purified by GST affinity chromatography and digested by enterokinase. Partly purified with Sephadex G-25, the final product, thanatin exhibited antimicrobial activity.

Key words: thanatin; GST fusion expression; *Escherichia coli*

抗菌肽是指在生物体内经诱导产生的一类小分子量, 具有抗菌活性的碱性多肽, 这类抗菌剂最初是从昆虫、哺乳动物、两栖动物等的防御系统中分离得到的。抗菌肽对革兰氏阳性、阴性细菌、病毒、原虫和发生病变的真核细胞等有杀伤作用 (Bulet *et al.*, 1999)。死亡肽 (thanatin) 是一种从刺蛾中分离得到, 迄今为止在所有已知昆虫抗菌肽中, 抗菌谱最广、抗菌活性最强的抗菌蛋白, 不仅对革兰氏阳性及阴性细菌, 而且对真菌也有杀灭作用 (Fehlbaum *et al.*, 1996)。死亡肽由 21 个氨基酸组成, 分子内有 4 个区域与其活性密切相关 (Fehlbaum *et al.*, 1996; Bulet *et al.*, 1999), 在第 11 位和第 18 位含两个 Cys 残基, 可形成分子内的二硫桥。通过对其截短类似物以及 D 型死亡肽的抗菌活性研究发现, 死亡肽可能通过多种机制对微生物

产生影响, 其抑菌的最小基序由 C 端环和相邻残基组成, C 末端 Met 残基的酰氨化对其抗菌活性是重要的 (Fehlbaum *et al.*, 1996)。核磁共振及分子动力学模拟研究了死亡肽在水溶液中的三维结构, 死亡肽分子从第 8 位残基到 C 末端可形成标准的 β -反向平行折叠结构, N 端结构高度可变 (Mandard *et al.*, 1998)。本文人工合成了死亡肽基因, 并采用融合蛋白形式在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中高效表达 GST-死亡肽融合蛋白。融合表达产物经肠激酶切割后获得有抗菌活性的死亡肽。

1 材料和方法

1.1 实验材料

表达质粒 pGEX-4T-1; *E. coli* TG1、BL21 为本

基金项目: 浙江省重点项目 (021102086)

作者简介: 翁宏飏, 男, 1970 年 3 月生, 博士研究生

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel: 0571-86404173; E-mail: cssswjsz@zaas.org

收稿日期 Received: 2002-08-26; 接受日期 Accepted: 2002-12-12

实验室保存; Taq DNA 聚合酶 TaKaRa 公司产品; pGEM T-载体为 Progenia 产品; 肠激酶 (enterokinase) 是 INVITROGEN 公司产品; IPTG 购自 Sigma 公司; 目的基因片段由上海生工生物工程公司合成; Pre-packed Glutathione Sepharose 4B column 为 Pharmacia 公司产品。

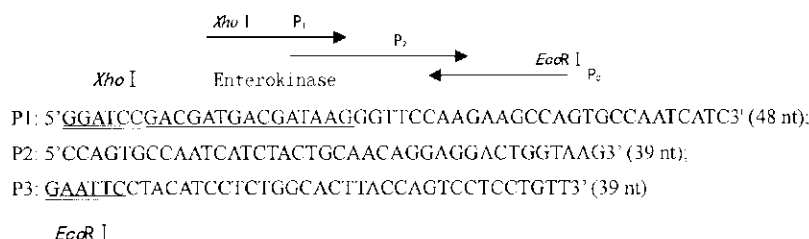


图 1 死亡肽基因的合成

Fig.1 Synthesis of thanatin gene

在总体积为 20 μ L 的 PCR 反应体系中, 加入 10 $\times$ Buffer 2 μ L, 4dNTP (25 mmol/L) 1 μ L, 片段 P1、P2 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 片段 P3 (2 μ mol/L) 1 μ L, Taq 酶 1.2 U。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C、30 s, 58 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、30 s, 30 循环; 72 $^{\circ}$ C、2 min。

1.2.2 死亡肽基因的克隆、序列分析及表达载体的构建: PCR 扩增合成的死亡肽基因用 T 载体法克隆; 序列分析委托 TaKaRa 公司进行; 序列正确的质粒经 Xho I 和 Not I 酶切后插入到表达载体 pGEX-4T-1 中, 得到表达质粒 pGEX-Tan (Ausubel *et al.*, 1995)。

1.2.3 死亡肽的融合表达: 挑选新转化含有重组质粒的 BL21 菌, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 次日再按 1:50 比例转入含有 25 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡 2 h 后加入 IPTG (终浓度为 0.2 mmol/L) 诱导, 4 h 后收集菌体, 超声破碎, 离心取上清液, 加入 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 进行 SDS-PAGE, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 13%。

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 mmol/L NaCl, 16 mmol/L Na₂HPO₄, 4 mmol/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 mmol/L Glutathione, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0) 洗脱, 收集洗脱峰。

1.2.5 肠激酶裂解融合蛋白及产物的初步纯化: 取亲和层析后的融合蛋白 5 mg 溶于 PBS 缓冲液中, 加入 50 U 肠激酶, 35 $^{\circ}$ C 温育 16 h, 加 2 mmol/L

1.2 方法

1.2.1 死亡肽基因的合成: 根据 GenBank 中死亡肽的序列, 人工合成死亡肽的三个特异片段 (图 1)。并在死亡肽基因 5' 端引入肠激酶 (EK) 切割位点。

DMSF 终止反应。Sephadex G-25 初步纯化酶切产物 (Ausubel *et al.*, 1995)。

1.2.6 Tricine-SDS-PAGE: 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 16.5% (Schagger and von Jagow, 1987)。

1.2.7 生物活性检测: 比浊法测定抑菌活性。取 1 mL 新鲜培养的对数生长期细菌 BL21, 用 LB 稀释 OD₆₅₀ 至 0.3, 取 10 μ L 菌液, 分别加入 140 μ L 肠激酶酶切产物系列稀释液, 补 LB 至 300 μ L, 37 $^{\circ}$ C 培养 3.5 h, 测定 OD₆₅₀ 细菌浓度。以培养液中所含酶切产物量对相对吸光度作图。

2 结果与分析

2.1 死亡肽基因的合成及 pGEX-Tan 表达载体的构建

三个死亡肽特异引物经 PCR 扩增后得一大一小为 90 bp 的死亡肽基因片段。将该片段克隆到 pGEM T-载体中, 转化大肠杆菌 TG1, 抽提重组质粒进行 DNA 测序, 结果与设计相符。用 Xho I 和 Not I 将死亡肽基因从 pGEM-Tan 中切出, 插入到表达质粒 pGEX-4T-1 中, 以特异性引物 P₁ 和 P₃ 直接 PCR 筛选阳性克隆, 得到 pGEX-Tan。

2.2 融合蛋白的分离纯化及电泳鉴定

将 pGEX-Tan 转化大肠杆菌 BL21, IPTG 诱导表达后, 收集菌体, 超声破菌, 经 PBS 悬浮, 加入终浓度为 1% 的 Triton X-100, 摇匀上亲和柱, 用洗脱缓冲液 (5 mmol/L Glutathione, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0) 洗脱。洗脱物经 13% SDS-PAGE, 考马斯

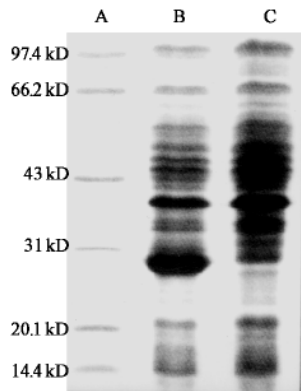


图 2 GST-死亡肽融合表达产物的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE analysis of GST-Tan expressed in *E. coli* BL21

A. 标准蛋白 protein molecular weight standards

B. 诱导后表达 pGEX-Tan 的大肠杆菌 BL21
E. coli BL21 with pGEX-Tan after induction

C. 诱导后不表达 pGEX-Tan 的大肠杆菌 BL21
E. coli BL21 without pGEX-Tan after induction

亮蓝 G250 染色，在 29 kD 有 1 条蛋白带（图 2）。凝胶扫描显示融合蛋白约占总蛋白的 20%。

2.3 融合蛋白的切割和切割后产物的活性检测

纯化的融合蛋白经肠激酶切割后，经 Tricine-SDS-PAGE，考马斯亮蓝 G250 染色，有一条 2.3 kD 左右的蛋白条带，与死亡肽分子量相吻合。29 kD 的蛋白带为融合蛋白 GST-死亡肽及切除死亡肽后的 GST 蛋白，23 kD 左右的小带可能是融合蛋白的降解物（图 3）。将细菌与系列稀释的肠激酶酶切产物共育 3.5 h 后，比浊法测定细菌生长。随着培养基中酶切产物的增加，细菌生长速度下降（图 4）。约 30 μ L 酶切产物即可抑制 50% 细菌生长，当培养基中酶切产物量达 80 μ L 时，细菌已基本不能生长，而对照肠激酶裂解缓冲液对细菌生长无影响。

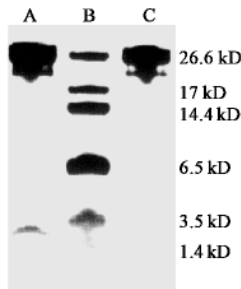


图 3 融合蛋白肠激酶酶解产物的 Tricine-SDS-PAGE 图谱

Fig.3 Tricine-SDS-PAGE analysis of thanatin after enterokinase digestion

A: 肠激酶裂解物 proteins after EK digestion

B: 标准蛋白 low molecular weight standards

C: 层析纯化蛋白 proteins purified by GST affinity chromatography

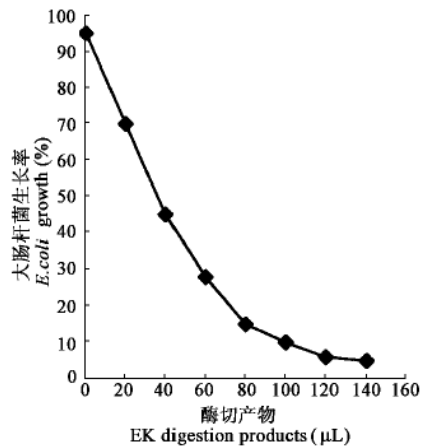


图 4 死亡肽抗菌活性测定

Fig.4 Antimicrobial activity of thanatin to *E. coli* BL21

Growth inhibition of *E. coli* BL21 was assayed by incubating serial EK digestion products with 10 μ L 0.3 OD₆₀₀ bacteria at 37°C for 3.5 hours.

3 讨论

抗菌肽是一类小分子多肽，由于其在组织中含
量低，分离获得大量的天然产物很困难，而人工合
成多肽的成本高，限制了其应用前景。因此，抗菌
肽的重组表达的研究很有意义。但由于抗菌肽对原
核生物具有明显的杀菌活性，因此不能在原核系统
中直接表达。死亡肽是迄今为止所发现抗菌活性最
强的昆虫防御肽，其最小抑菌浓度低于 2.5 μ mol/L
(Fehlbaum *et al.*, 1996)。已利用人工合成的截短类
似物、(2D) ¹H-NMR 及分子模拟等技术对其高级
结构、结构功能关系及生化特性进行了研究。本文
根据文献报道序列，人工合成死亡肽基因片段，利
用 PCR 扩增得到完整的死亡肽基因，构建了 GST
融合表达载体，避免直接表达时宿主菌的死亡，同
时保护抗菌肽免受蛋白酶的降解。转化大肠杆菌后
，获得高效表达。利用 GST 亲和柱层析纯化融合
蛋白，简化纯化操作步骤，减少融合蛋白的损失。
表达产物经肠激酶酶切后显示出较强的抗菌活性。
由于死亡肽是小分子多肽，分子量约为 2.5 kD，同
时融合蛋白经肠激酶酶切后得到的死亡肽量较少，
给分离纯化带来困难。目前尚无法确定蛋白酶酶切
产物中死亡肽的含量，因此还不能定量分析其抗菌
浓度。由于死亡肽序列中 C-末端的 Met 残基对其
完全活性是必需的 (Fehlbaum *et al.*, 1996)，而
BrCN 切割融合蛋白会造成 Met 残基高丝氨酸内
脂化，影响死亡肽的活性 (Taguchi *et al.*, 2000)，

因此在融合表达产物的加工中不能使用 BrCN 切割。如何降低融合蛋白的加工成本，获得较大量的死亡肽蛋白，以便定量分析其抗菌活性，我们将作进一步研究。

致谢 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。

参 考 文 献 (References)

Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K, 1995. Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc.

Bulet P, Hetru C, Dimarcq J L, Hoffmann D, 1999. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Developmental and comparative immunology*; 23: 329 – 344.

Fehlbaum P, Bulet P, Chernyds S, Briand J P, 1996. 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*, 93: 1 221 – 1 225.

Mandard N, Sodano P, Labbe H, Bonmatin M, Bulet P, Hetru C, Ptak M, Vovelle F, 1998. Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensional nuclear magnetic resonance data. *European Journal of Biochemistry*, 256 (2): 404 – 410.

Schagger H, von Jagow G, 1987. Tricine sodium decyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kD. *Analytical Biochemistry*, 166: 368.

Taguchi S K, Dwasako K, Suenaga A, Okada M, Momose H, 2000. Functional mapping against *Escherichia coli* for the broad-spectrum antimicrobial peptide, thanatin, based on an *in vivo* monitoring assay system. *J. Biochem.*, 128: 745 – 754.