

# 蛙皮素-蜂毒素杂合肽基因在大肠杆菌中的克隆与诱导表达

黄 音\* \* 刘飞鹏\* 周天鸿 朱嘉明

(暨南大学生物工程系 广州 510632)

关键词 抗菌肽 MA-E 基因 大肠杆菌 抗菌活性

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0207-04

抗菌肽(Antibacterial peptides)原指昆虫体内经诱导产生的一类分子量在 4kD 左右,具有抗菌活性的碱性多肽物质<sup>[2]</sup>。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及阴性细菌、病毒、原虫和发生病变的真核细胞等有杀伤作用,具有很强的广谱抑菌作用,但对正常哺乳动物细胞无杀伤作用<sup>[3]</sup>。蛙皮素还具有抗肿瘤活性而没有溶血活性<sup>[4]</sup>,虽然蜂毒素具有溶血活性,但其溶血功能区位于 C 端的亲水区域<sup>[5]</sup>,两者的极性区域正好相反。据研究表明抗菌肽都会形成两亲螺旋结构的一致构象,并与其抗菌活性密切相关<sup>[6,7]</sup>。抗菌肽的基本结构模式被认为在疏水环境中形成螺旋-卷曲-螺旋的结构。目前一般认为,抗菌肽作用于细胞膜,在细胞膜上形成跨膜的离子通道,破坏膜的完整性,造成细胞内容物的泄漏,从而杀死细胞<sup>[8,9]</sup>。

抗菌肽具有分子量小、热稳定、水溶性好、抗菌谱广及材料来源丰富等特点。科学家们已注意到  $\beta$ -内酰胺类抗生素的过敏反应以及长期使用导致抗药菌株的产生,而抗菌肽不会诱导抗药菌株的产生。我们从天然蛙皮素亲水性 N 端取 14 个氨基酸(截去头 2 个氨基酸)作为杂合肽 N 端,从天然蜂毒素疏水性 N 端取 13 个氨基酸作为杂合肽 C 端,中间加上一保守性绞链区转折点[Ala-Gly-Pro],经 Chou-Fasman 法<sup>[1]</sup>进行结构预测后,适当对其中某些氨基酸位点加以修改,优化设计蛙皮素与蜂毒素杂合肽基因是本工作的创新特点,国内外尚未见报道。基因全长 145bp,包括 38 个氨基酸编码序列,分 4 段人工合成。连接后克隆到大肠杆菌表达载体上进行表达。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 DH5 $\alpha$ 、JM109、K<sub>12</sub>D<sub>31</sub>及质粒 pUC18 为本实验

室保存。pBV220 质粒为赵利淦教授惠赠。目的基因 4 条片段由上海生工生物工程有限公司合成。MA-E 多肽由北京赛百盛公司合成。Wizard Plus Minipreps DNA Purification System、IPTG、X-gal 购自 Promega 公司;Poly-His protein purification Kit 购自 Boehringer Mannheim Co.;T4 polynucleotide kinase、限制酶、T4 DNA 连接酶分别为 MBI 和 SABC 公司产品。Sephadex G-10 购自上海生物化学试剂公司。Tris、丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺购自上海生工生物工程有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 目的基因片段的磷酸化、复性、连接:

全基因分段合成:



在一 1.5mL 离心管中加入 Buffer A 8 $\mu$ L,0.1mmol/L dATP 4 $\mu$ L, dH<sub>2</sub>O 38 $\mu$ L, T4 polynucleotide kinase(10u/ $\mu$ L) 10 $\mu$ L,平均分成两管。第一管分别加入 0.26 $\mu$ g/ $\mu$ L 合成片段(1)溶液 5 $\mu$ L,0.268 $\mu$ g/ $\mu$ L 合成片段(2)溶液 5 $\mu$ L,第二管分别加入 0.32 $\mu$ g/ $\mu$ L 合成片段(3)溶液 5 $\mu$ L,0.31 $\mu$ g/ $\mu$ L 合成片段(4)溶液 5 $\mu$ L。两管 37 $^{\circ}$ C 水浴 3h。每管再分别加入 4.4 $\mu$ L 1mol/L NaCl,沸水浴 30s 后,48 $^{\circ}$ C 保温 8~12h,经乙醇沉淀回收。两管 DNA 沉淀用微量 dH<sub>2</sub>O 溶解,混合后定容 8.5 $\mu$ L,再加入 1 $\mu$ L 10 $\times$  T4 Ligase Buffer, T4 DNA ligase (4wiss u/ $\mu$ L) 0.5 $\mu$ L,15 $^{\circ}$ C 保温 12h。

目的基因片段磷酸化按照 MBI 公司及上海生工生物工程有限公司的产品说明书进行,复性温度计算按《分子克隆实验指南》<sup>[10]</sup>。

1.2.2 重组、克隆和 DNA 序列分析:质粒制备、限制酶酶解反应、琼脂糖凝胶电泳、DNA 片段回收、连接反应、大肠杆菌

收稿日期 2000-07-07,修回日期 2000-09-06。

基金项目 广东省自然科学基金资助(970636)。

\* 通讯作者。Tel 86-20-85226792;Fax 86-20-85221941;E-mail:tluifp@jnv.edu.cn

\* \* 现在工作单位:上海复旦大学遗传所科学楼 618。

转化等均依照《现代分子生物学实验技术》<sup>[11]</sup>进行, DNA 序列分析由中山医科大学达安基因公司测定。

**1.2.3 克隆基因在大肠杆菌中的表达:**带有克隆基因的表达质粒 pBMA-E 转化宿主菌 DH5 $\alpha$ , 于 LB 培养液(含 60 $\mu$ g/mL 氨苄青霉素)中 32 $^{\circ}$ C 培养过夜, 次日以 1:100 接种 2XYT 培养液(含 60 $\mu$ g/mL 氨苄青霉素), 32 $^{\circ}$ C 摇床培养至  $A_{600}$  约为 0.6, 升温至 42 $^{\circ}$ C 诱导 4h。

**1.2.4 表达产物的鉴定分析:**离心收集菌体, 用凝胶上样缓冲液直接溶破, 制成全蛋白样品; 或 TE 缓冲液洗涤、悬浮, 超声波破碎 4 $^{\circ}$ C, 15000r/min 离心 15min, 收集上清, 加入等体积 2 $\times$  SDS 凝胶上样缓冲液。进行 Tricine-SDS-PAGE<sup>[12]</sup>。

**1.2.5 表达产物的亲和层析、纯化:**上述表达产物经金属离子亲和柱层析纯化, 方法按 Boehringer Mannheim 公司的产品说明书进行。平衡液为磷酸缓冲液, 上样后以含不同浓度的咪唑的磷酸缓冲液洗脱。

**1.2.6 抗菌活性测定<sup>[13]</sup>:**

(1) 经亲和柱层析所收集样品经 Sephadex G-10 脱盐、真空冷冻抽干、用 dH<sub>2</sub>O 重悬。

(2) 大肠杆菌 K<sub>12</sub>D<sub>31</sub> 在 3mL LB 培养液中培养至  $OD_{570nm}$  约为 0.4, 加入 20 $\mu$ L 待测样品, 合成多肽及表达的多肽的浓度均为 4 $\mu$ g/ $\mu$ L。25 $^{\circ}$ C 30min 后读取  $OD_{570nm}$  值, 按下式计算杀菌效价。

$$\text{杀菌效价} = \sqrt{(OD_{570nm,t_0} - OD_{570nm,t}) / OD_{570nm,t}}$$

## 2 结 果

### 2.1 MA-E 基因合成及 pBMA-E 表达载体的构建

目的基因分 4 段人工合成, 经磷酸化、复性、连接后, 得到完整的目的基因 MA-E, 经 Tricine-SDS-PAGE, 用银染法染色显示连接成功的带(图 1)。MA-E 基因插入 pUC18 的 *Eco*RI 和 *Sal*I 位点, 转化大肠杆菌 JM109, 抽提重组质粒作

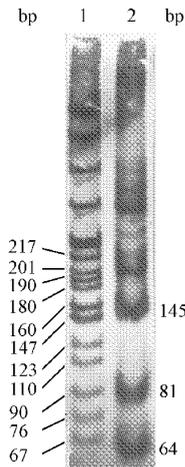


图 1 MA-E 基因连接的电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis analysis of the ligation of MA-E gene (10% PAG/silver staining)

1. MW marker, pBR322/*Msp* ;
2. MA-E gene

DNA 测序, 结果与设计符合要求。MA-E 基因从重组质粒 pUM-E 上切下, 插入 pBV220 的相应位点, 转化 DH5 $\alpha$ 。抽提重组质粒, 经 *Eco*RI 和 *Sal*I 双酶切, 得一段, 其大小为 145bp, 证明 MA-E 成功克隆到 pBV220 载体上。

### 2.2 表达产物的电泳分析

表达菌体全蛋白及超声破碎细胞后的上清进行电泳分析。经 42 $^{\circ}$ C 诱导的含 pBMA-E 的菌体表达分子量比 2.8kD 大一些的 MA-E 多肽。见图 2 中第 4 泳道。升温诱导后 4h 的表达量最高, 经凝胶扫描测定约为可溶性蛋白的 16%。

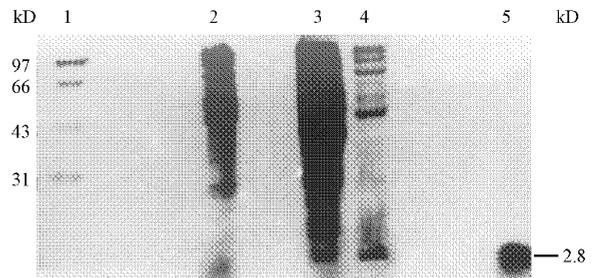


图 2 MA-E 基因表达产物的电泳分析

Fig. 2 Tricine-SDS-PAGE of expression products of MA-E gene

1. Protein molecular weight marker (97, 66, 43, 31kD)
2. *E. coli* carrying pBV220 after thermal induction ;
3. *E. coli* carrying pBMA-E after thermal induction ;
4. supernatants of ultrasonic lysate of *E. coli* carrying pBMA-E after thermal induction ;
5. Synthetic hybrid MA-E peptide as marker.

### 2.3 表达产物的纯化

利用 His 与金属  $Zn^{2+}$  的亲和性, 杂合肽经金属螯合柱层析被纯化(图 3)。菌体破碎上清以 1mL/min 过柱, 紫外吸收记录图谱显示 4 个峰, 峰 1 为上样峰(不吸附于柱的成分), 峰 2 为 Elution Buffer 2 洗下的组份, 峰 3 为 Elution Buffer 3 洗下的组份, 目标多肽位于峰 3 中, 峰 4 为柱再生液洗下的组份。

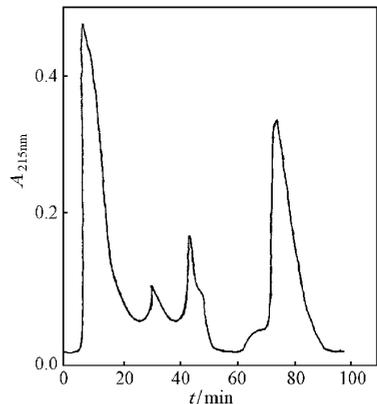


图 3 MA-E 多肽的 poly-His 亲和层析分离图

Fig. 3 Poly-His protein purification chromatogram of MA-E peptide

### 2.4 MA-E 杂合抗菌肽的抗菌活性

以大肠杆菌 K<sub>12</sub>D<sub>31</sub> 正常生长的菌液作为对照, 测定合成

MA-E 和表达 MA-E 两类样品的杀菌效价。表 1 显示 表达 MA-E 多肽的杀菌效价比合成 MA-E 多肽低得多,可能的原因之一是因为表达的 MA-E 多肽尚未切去 poly-His 尾巴,影响抗菌活性。

表 1 用液相法检测 MA-E 多肽的抗菌活性

Table 1 The detection of the antibacterial activity of MA-E peptide by liquid turbidity method

	Void	Synthetic MA-E peptide/4×(μg/μL)	Expressing MA-E peptide/4×(μg/μL)
	0.407	0.382	0.400
Value/OD	0.401	0.379	0.381
	0.401	0.376	0.389
Mean	0.403	0.379	0.390
Bactericidal titre		0.254	0.182

### 3 讨论

本实验构建了含 MA-E 杂合肽基因的原核重组表达载体,转化大肠杆菌后,经温度诱导表达,获得较理想的结果。在我们设计 MA-E 氨基酸序列时,在其 N 端加上 6 个组氨酸的短肽,多肽表达后可通过金属离子亲和柱层析纯化,简化纯化操作以减少目的多肽的损失,最后 6 个组氨酸的短肽可通过 6 个组氨酸与 MA-E 之间的肠激酶或酵母胞内蛋白酶酶切位点切除。实验中我们发现,在传统的 laemmli 不连续凝胶系统中,分子量小于 10kD 的多肽和蛋白,会因与 SDS 的共迁移而影响了分离度,对一些小分子多肽的电泳分析时,电泳、固定、染色、脱色过程中极易扩散丢失,银染色后小于 8kD 的标准品也无着色带。据文献介绍,我们采用一种修改的缓冲系统的 Tris-Tricine<sup>[12]</sup>方法,可使 SDS 和多肽得到分离,即使不采用梯度胶的方法,分离胶采用 49.5% T、30% C,对于 2kD 左右的小肽,也可得到理想的效果。但要注意脱色时间不宜过长,以防小肽的扩散和丢失。

我们采用了 pBV220 高效表达载体,此载体已成功地高效表达了  $\gamma$  干扰素(IFN $\gamma$ )、人白细胞介素-2(IL-2)和人肿瘤坏死因子(TNF)等<sup>[14]</sup>,但 MA-E 基因在此载体的表达效率仍偏低,究其原因可能有(1)抗菌杂合肽 MA-E 本身有抑制细菌生长作用,表达后对自身宿主菌有杀伤作用,限制其表达产量的提高。这些有待选择某些具有耐受性的细菌(eg. BL21)或可通过选择酵母表达系统来提高表达量(2)MA-E 基因采用酵母偏爱密码<sup>[16]</sup>设计,其中含有 *E. coli* 稀有密码子,可能影响表达效率。但也有资料表明关于翻译延伸过程中密码子选择对表达效率的影响尚无定论,密码子选择与基因表达之间没有明确的因果关系,有些带有低密码倾向的外源基因在 *E. coli* 中也得到高水平的表达。但在另一些情况下,最适密码的使用可显著提高外源基因的表达水平,因此导致 MA-E 在 *E. coli* 中表达效率较低的因素有待进一步研

究。表达 MA-E 杂合肽必须用肠激酶切去外加的肽段后,才能产生和合成 MA-E 相同长度的肽。本文只对 MA-E 杂合肽进行了初步的纯化和生物活性检测,进一步的纯化工作及广泛的活性测试正在进行,结果将另文发表。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] MI L H(米鲁华) *et al.* Proteins Structure Prediction and Molecular Design(蛋白质的结构预测与分子设计), Beijing: Beijing Agriculture Press, 1993
- [2] Boman H G, Peptide Antibiotics and their Role Innate Immunity, *Annu Rev Immunol*, 1995, **13**: 61-92
- [3] FU N Y(傅南雁) *et al.* Research Progress in Antibacterial Peptides, *Chemistry of Life(生命的化学)*, 1998, **18**(2): 25-28
- [4] Michael Z *et al.* Antimicrobial Activity of Synthetic Magainin Peptides and Several Analogues, *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 1988, **85**: 910-913
- [5] Boman H G *et al.* Antibacterial Peptides: Key Components Needed in Immunity, *Cell*, 1991, **65**: 205-207
- [6] Iwahori A. Synthesis of Reversed magainin 2 Analogs Enhanced Antibacterial Activity, *Biol Pharm Bull*, 1997, **20**(3): 267-270
- [7] Iwahori A, On the Antibacterial Activity of Normal and Reversed Magainin 2 Analogs Against Helico-bacter Pylori, *Biol Pharm Bull*, 1997, **20**(7): 805-808
- [8] Matsuzaki K *et al.* Interactions of an Antimicrobial Peptide, Magainin 2, with Outer and Inner Membrane of Gram-negative Bacteria, *Biochem Biophys Acta.*, 1997, **1327**(1): 119-130
- [9] Matsuzaki K *et al.* Modulation of Magainin 2-lipid Bilayer Interactions by Peptide Charge, *Biochemistry*, 1997, **36**(8): 2104-2111
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Molecular Cloning (A Laboratory Manual) 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [11] LU S I X(卢圣栋). Current Protocols for Molecular Biology(现代分子生物学实验技术), Beijing: High Education Press, 1993
- [12] YANG L R(杨联萍) *et al.* Analysing peptide of Low Weights Molecular with SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis, *Progress in Biotechnology(生物工程进展)*, 1998, **18**(6): 49-51
- [13] Masayuki O, Shunji N. Purification and characterization of an antibacterial protein from hamolymp of sarcophaga peregrina (flesh-fly) Larvae, *Biochemistry*, 1997, **38**(10): 1973-1982
- [14] ZHANG Z Q(张智清) *et al.* High level expression of human interferon- $\gamma$  cDNA in *E. coli* with a plasmid containing P<sub>RP<sub>L</sub></sub> promoter and CIts857 gene, *Chinese Journal of Virology(病毒学报)*, 1998, **4**(2): 97-99
- [15] Jeffrey L. B, Codon Selection in Yeast, *The Journal of Biological Chemistry*, 1982, **257**(6): 3026-3031

## Cloning and Expression of a Synthetic Gene Encoding Magainin-Melittin Hybrid Peptide in *Escherichia coli* and Studies on its Antibacterial Activity

HUANG Yin LIU Fei-Peng\* ZHOU Tian-Hong ZHU Jia-Ming

(Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract** A hybrid peptide gene was designed and synthesized. Its encoding peptide is constructed from residues 3~14 of magainin and residues 1~13 of melittin. The MA-E gene was cloned into plasmids pUC18 and pBV220. By DNA sequencing, the whole sequences of this gene is confirmed to be correct. The recombinant plasmid pBMA-E was expressed in *E. coli* DH5 $\alpha$ . A gene product band can be seen with Tricine-SDS-PAGE. The MA-E hybrid peptide was purified by immobilized metal affinity chromatography. Bioactivity assay was carried out in liquid turbidity method. The bactericidal value to *E. coli* K<sub>12</sub>D<sub>31</sub> is 0.182.

**Key words** magainin, melittin, hybrid peptide, gene expression

Received: July 7, 2000

This work was supported by the National Science Foundation of Guangdong (970636).

\* Corresponding author. Tel 86-20-85226792; Fax 86-20-85221941; E-mail: liufp@jnu.edu.cn  
中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>