

抗菌肽 GK1 在大肠杆菌中的融合表达

陆海荣^{1,2}, 李国栋¹, 吴宏宇¹, 黄晋江¹, 汪世龙², 黄青山^{1,3}

1 上海高科联合生物技术研发有限公司, 上海 201206

2 同济大学生命科学与技术学院蛋白质研究所, 上海 200092

3 复旦大学生命科学院遗传学研究所遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

摘要: 为高效表达抗菌肽 GK1 并避免 GK1 的高抗菌活性对大肠杆菌宿主菌的致命影响, 将经改造后的人胰岛素原 (*mhPI*) 与 *GK1* 的融合基因 (*mhPI-GK1*) 克隆到表达载体 pET28a 中, 构建出表达质粒 pET28a-*mhPI-GK1*, 转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行表达。融合蛋白在大肠杆菌中以包涵体形式表达, 表达量占菌体总蛋白的 20%。经 CNBr 裂解、阳离子交换层析和 RP-HPLC 纯化后, 每升发酵液可获得 5.7 mg 纯度大于 97% 的重组 GK1。质谱检测显示重组 GK1 的分子量为 2794.0 D, 抑菌活性实验表明纯化后的重组 GK1 和化学合成 GK1 具有相同的抗菌活性。为利用基因工程方法大规模生产 GK1 奠定了基础。

关键词: 抗菌肽, 融合蛋白, 大肠杆菌

Fusion Expression of the Antimicrobial Peptide GK1 in *Escherichia coli*

Hairong Lu^{1,2}, Guodong Li¹, Hongyu Wu¹, Jinjiang Huang¹, Shilong Wang², and Qingshan Huang^{1,3}

1 Shanghai HI-Tech United Bio-Technological R&D Co. Ltd., Shanghai 201206, China

2 Institute of Protein Research, Tongji University, Shanghai 200092, China

3 State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: The antimicrobial peptide GK1, a derivative of Cecropin A, shows high antimicrobial activities against Gram-positive and Gram-negative bacteria. To avoid the lethal effects on *Escherichia coli* host cells during its expression, the *GK1* gene was complexed with a modified human proinsulin (*mhPI*) gene, inserted into the vector pET28a to construct the recombinant expression plasmid (pET28a-*mhPI-GK1*) and then transformed into BL21(DE3). A fusion protein was expressed and resulted in insoluble inclusion bodies counting 20% (*W/W*) of total cellular proteins. Recombinant GK1 was cleaved from the *mhPI-GK1* fusion protein by cyanogen bromide (CNBr) and purified by cation exchange chromatography and reverse-phase HPLC. The final concentration of recombinant GK1 was 5.7 mg/L *Escherichia coli* culture and the purity was above 97%. Its molecular weight measured by Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) was 2794 D, similar to that of the synthetic GK1. In addition, they have similar antibacterial activity. The results demonstrated that *mhPI* was capable of mediating high-level *GK1* gene expression.

Keywords: antimicrobial peptide, fusion protein, *Escherichia coli*

Received: April 16, 2007; **Accepted:** May 29, 2007

Supported by: the Shanghai Key Technologies R&D Program (No. 044319223).

Corresponding author: Qingshan Huang. Tel: +86-21-65642814; E-mail: qshuang@fudan.edu.cn
上海市重点科技攻关项目(No. 044319223).

抗菌肽是生物体经诱导产生的具有抗菌活性的小分子多肽,是生物先天性免疫的重要组成部分^[1-4],由于抗菌肽具有广谱、高效抗菌且不易产生耐药性的特点,将抗菌肽开发成为治疗耐药菌感染药物是近年来的研究热点,迄今国外多个抗菌肽已进入临床试验阶段^[5,6]。

抗菌肽 GK1(专利号为 PCT/CN 03/00522)是在昆虫抗菌肽 Cecropin A^[7]基础上改造获得的一种高抗菌活性多肽,由 Cecropin A 的 N 端 1~8 序列和一段标准的 α -螺旋结构序列杂合而成的 23 肽(KWKLFFKIGIGKVVKKVLLKVLK),对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均有很好的抗菌活性,其杀菌活性显著强于 Cecropin A,最小抑菌浓度仅是 Cecropin A 的 1/100 左右^[8],GK1 有望开发成为一种新的抗感染药物。通过固相多肽合成的方法制备 GK1,不但成本比较高,还有环境污染的问题,因此需要寻找更为经济有效的方法以便大量地制备这种抗菌肽。

抗菌肽基因工程表达主要在大肠杆菌和酵母菌系统中进行,虽然酵母菌表达体系具有直接分泌表达小分子多肽及翻译后加工等优势,但酵母菌生长周期长,纯化困难,含较多碱性氨基酸的抗菌肽易被降解,表达效率并不高^[9],该表达系统还存在 N 端信号肽加工不完全的问题^[10],直接影响到抗菌肽的活性。大肠杆菌表达系统具有生长快、成本低和表达量高等优势,抗菌肽分子量小且对大肠杆菌本身具有毒性,不能直接表达,一般采用融合表达策略^[11-16],本文采用人胰岛素原作为融合载体蛋白表达 GK1,主要根据以下 4 个因素:(1)它能在大肠杆菌中高效表达^[17],其结构复杂,富含二硫键,有助于融合蛋白形成稳定的包涵体;(2)它含有较多酸性氨基酸可以中和抗菌肽中的正电荷;(3)它不含甲硫氨酸位点,不会影响溴化氰(CNBr)裂解;(4)它分子量小,抗菌肽在融合蛋白中的比例相对较高。本研究将 GK1 和 mhPI 的融合基因

插入 pET28a 载体,在大肠杆菌中获得高效表达,为进一步利用基因工程方法大规模生产 GK1 奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

表达载体 pET28a(+),大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)均购自 Novagen 公司;检测抗菌肽活性的菌株:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC25923,大肠杆菌(*Escherichia coli*)ATCC25922,绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)ATCC15442,购自中国生物制品检定所。

1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶购自 NEB 公司;pUC Mix Marker、Tricine 购自上海生工生物工程技术有限公司;CNBr 购自 FLUKA 公司;低分子量标准蛋白质购自 AMRESCO 公司;超低分子量标准蛋白质购自华美公司;Cecropin A 购自 SIGMA 公司;质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自上海舜生物工程有限公司。FR-200 凝胶成像系统购自上海复日科技公司,Gold system HPLC 购自美国 BECKMAN COULTER, Bio-rad 550 酶标仪购自 BIO-RAD 公司。

1.3 方法

1.3.1 mhPI-GK1 融合基因的获得

为避免表达的抗菌肽 GK1 对宿主菌产生毒性,选择经改造的人胰岛素原(mhPI)作为融合载体蛋白和 GK1 融合表达。mhPI-GK1 融合蛋白含 101 个氨基酸,包括 N 端先导肽(MATMITDSL A),人胰岛素原 B 链(1~28 肽),抗菌肽 GK1 序列(1~23 肽),人胰岛素原 C 链(3~13 肽、28~33 肽),人胰岛素原 A 链(1~21 肽)以及在抗菌肽 GK1 序列两端各加上 CNBr 裂解位点甲硫氨酸(Met) (如图 1)。

根据 mhPI-GK1 氨基酸序列,选用大肠杆菌偏爱密码子,人工合成编码 mhPI-GK1 的基因序列,并

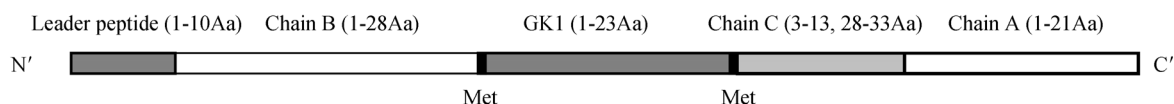


图 1 mhPI-GK1 融合蛋白示意图

Fig. 1 A schematic of the fusion protein mhPI-GK1

在 5' 端引入 *Nco* I 位点, 3' 端引入 *Hind* III 位点。*mhPI-GK1* 基因的人工合成由上海生工生物工程技术有限公司完成, 合成基因克隆于 pUC57 载体的多克隆位点, 重组质粒命名为 pUC57-mhPI-GK1。人工合成的基因序列如下:

```
CC ATG GCT ACC ATG ATT ACG GAT TCA
CTG GCC TTT GTT AAC CAA CAC CTG TGC GGC
TCC CAC CTG GTG GAA GCT CTG TAC CTG GTG
TGC GGT GAA CGT GGC TTC TTC TAC ACC CCG
ATG AAA TGG AAA CTC TTC AAG AAA ATC GGC
ATC GGT AAA GTT GTA AAG AAG GTA CTC AAG
AAA GTT CTG AAG ATG GAA GCT GAG GAC
CTC CAG GTT GGT CAG GTA GAA CTG GAG
GGT TCT CTG CAG GGC ATT GTG GAA CAA TGC
TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTG TAC CAG CTG
GAG AAC TAC TGC AAC TGA AGC TT.
```

1.3.2 工程菌的构建和表达

pUC57-mhPI-GK1 经 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切, 割胶回收 *mhPI-GK1* 基因片段, 克隆到 pET28a(+) 载体的 *Nco* I 和 *Hind* III 位点之间, 构建重组表达质粒 pET28a-mhPI-GK1, 阳性克隆送上海英骏生物公司测序。将测序正确的表达质粒转化 BL21(DE3) 感受态细胞, 获得 *mhPI-GK1* 的表达工程菌 BL21(DE3)/pET28a-mhPI-GK1。挑单克隆接种于 LB 培养液(含 0.5% 葡萄糖和 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜, 按 1% 接种到相同的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 $OD_{600} \approx 0.9$ 时, 加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养, 诱导 4h 后, 6000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 15% SDS-PAGE 检测并分析重组蛋白表达量。

1.3.3 重组 GK1 的纯化及鉴定

菌体沉淀重悬于破菌缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA pH 8.0), 在冰浴下超声破菌。破菌液 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 20 min, 收集含有包涵体的沉淀部分。包涵体用缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl pH 8.0)清洗, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 r/min 离心 20 min, 沉淀溶于尿素变性缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 8 mol/L Urea pH 8.0), 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清, 加入终浓度为 1 mol/L 的盐酸和 0.5 mol/L 的 CNBr 裂解融合蛋白, 室温放置 6h 后, 反应混合物与 ddH₂O 1:1 稀释并冷冻干燥, 冻干粉溶于等体积的 ddH₂O, 再 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 20 min,

去除沉淀。

将离心后上清进样至以 25 mmol/L PBS、40% ACN pH 6.5 缓冲液平衡的 Source 15S 阳离子交换层析柱(6.4 mm \times 30 mm), 0-0.5 mol/L NaCl 线性梯度洗脱, 收集目的峰。将阳离子交换层析收集峰物进一步以 RP-HPLC(ODS C₁₈ 柱, 4.6 mm \times 250 mm) 纯化。溶剂 A 为 0.05% TFA, 1% CAN, 溶剂 B 为 0.05% TFA, 80% CAN, 梯度洗脱条件: 10%B 10 min, 10%~45% B 10 min, 45%~55% 20 min, 55%~100% B 10 min。纯化后的样品冻干后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存备用。

以化学合成 GK1(本室自制)为对照, 用 16.5% Tricine-SDS-PAGE 分析纯化产物。LC/MS 检测其分子量。RP-HPLC 分析样品纯度。以牛血清白蛋白为标准蛋白, 用 BCA 法测定总蛋白浓度, 再通过胶密度扫描对目的蛋白进行定量。

1.3.4 重组 GK1 的最小抑菌浓度

参照 Park 等^[18]的方法进行。将金黄色葡萄球菌 ATCC25923, 大肠杆菌 ATCC25922, 绿脓杆菌 ATCC15442 复苏, 细菌在 LB 斜面培养基中生长至对数中期, 经过 LB 液体培养基逐级稀释至细菌浓度为 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL, 分别取 100 μL 菌液加入 96 孔板中, 以无菌生理盐水将纯化后的重组 GK1、化学合成 GK1 和 Cecropin A 按一定比例稀释后, 每孔中加入 10 μL 。将 96 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 酶标仪检测 OD_{620} 值。计算细菌的存活率和抑菌率。

2 结果

2.1 工程菌的构建和表达

重组质粒 pUC57-mhPI-GK1 经 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切, 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 在 300 bp 左右处有一条与预期值相符的目的片段(如图 2), 将其定向插入 pET28a(+) 后, 得到 pET28a-mhPI-GK1 表达质粒。DNA 测序结果证实插入表达载体的目的基因完全正确。表达质粒转化 BL21(DE3), 经 IPTG 诱导后, 表达产物行 SDS-PAGE 分析, 在 11 kD 处有一条明显的重组蛋白表达条带, 与预期值相符, 融合蛋白约占菌体总蛋白的 20%, 分析菌体超声上清和沉淀, 实验表明 *mhPI-GK1* 融合蛋白是以包涵体形式表达(图 3)。

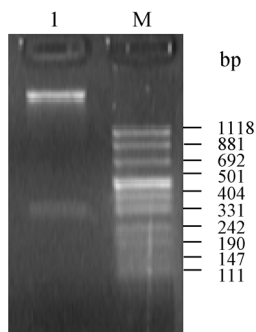


图2 重组质粒 pUC57-mhPI-GK1 的酶切分析
Fig.2 Restriction analysis of recombinant plasmid pUC57-mhPI-GK1

1: pUC57-mhPI-GK1/ *Nco* I + *Hind* III; M: pUC mix marker.

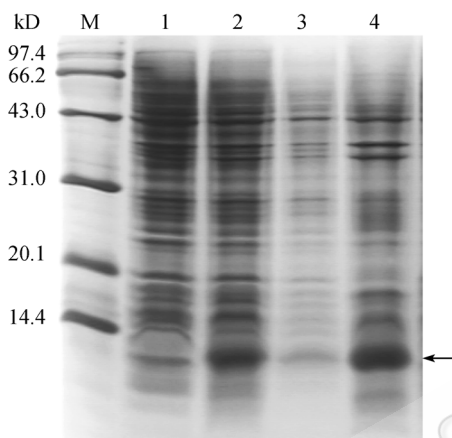


图3 重组表达质粒 pET28a-mhPI-GK1 在 BL21(DE3) 中的表达

Fig.3 The expression of recombinant plasmid pET28a-mhPI-GK1 in BL21(DE3)

M: protein marker; 1: uninduced; 2: induced by IPTG; 3: supernatant of sonicated cells; 4: pellet of sonicated cells

2.2 重组 GK1 的纯化及鉴定

包涵体用尿素溶解后, 经 CNBr 裂解, 裂解上清通过 Source 15S 阳离子交换层析和 RP-HPLC 纯化, 得到了纯的重组 GK1。经 LC/MS 检测后证实其分子量(2794 D)与理论值相符(图 4)。比化学合成 GK1 的分子量(2709 D)大, 是因为经 CNBr 裂解后的重组 GK1 在 C 末端多了一个高丝氨酸内酯。

Tricine-SDS-PAGE 分析结果显示, 在 3 kD 处有一条大小与化学合成 GK1 一致的条带(图 5), 由于 GK1 的碱性氨基酸比例非常高且分子量较小, 其在 Tricine-SDS-PAGE 图上的迁移率变小, 因此显示的分子量略有偏大。

RP-HPLC 纯度分析结果显示重组 GK1 纯化产物的纯度大于 97%(图 6)。纯化步骤及纯化效率的计算结果见表 1。经过两步纯化之后, 每升工程菌发酵

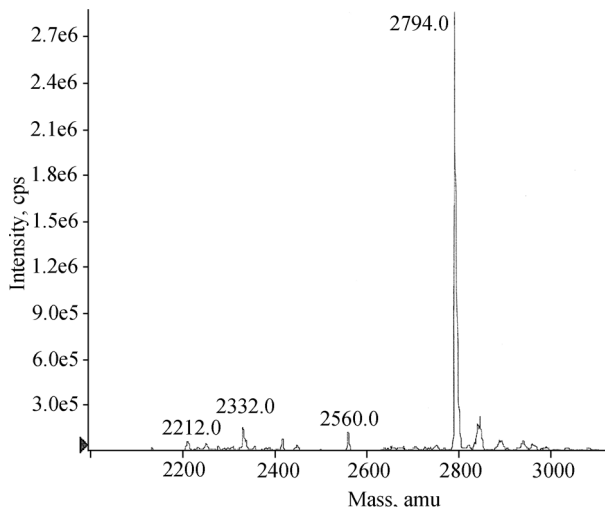


图4 重组 GK1 的分子量质谱图
Fig. 4 Mass spectrometry(EI-MS) of recombinant GK1

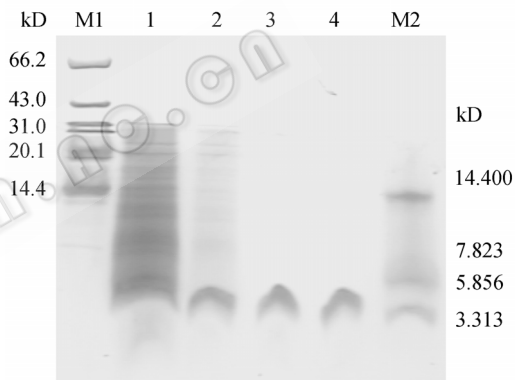


图5 重组 GK1 的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig. 5 Tricine-SDS-PAGE analysis of recombinant GK1
M1: protein molecular weight marker; 1: CNBr cleaved inclusion body; 2: recombinant GK1 purified by cation-exchange chromatography; 3: recombinant GK1 purified by reverse-phase HPLC; 4: synthetic GK1 control; M2: polypeptide molecular weight marker

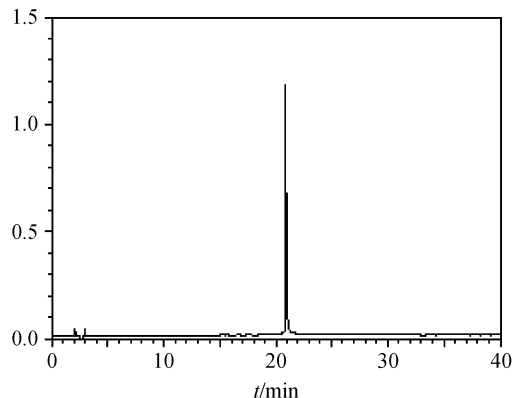


图6 重组 GK1 的 HPLC 纯度分析
Fig. 6 Reverse-phase HPLC analysis of recombinant GK1

液最终可获得 5.7mg 纯度大于 97% 的重组 GK1。

表 1 重组抗菌肽 GK1 的纯化
Table 1 Purification of recombinant GK1

Step	Total protein /mg ^a	Amt of recombinant GK1/mg	Yield/%
Inclusion body	112.5	21.1 ^b	
Cleavage, centrifugation	82	11.8 ^c	56
Source 15S	9.3	7.4 ^c	35
RP-HPLC	5.7	5.5 ^c	26

^aTotal protein concentration was determined by BCA protein assay.

^bTheoretical; calculated from the difference in the molecular masses of GK1 and mhPI-GK1.

^cThe amount of recombinant GK1 after Cleavage, centrifugation and purification were determined by densitometric analysis of SDS-PAGE gels.

2.3 重组 GK1 的最小抑菌浓度

抑菌活性实验结果表明, 经纯化的重组 GK1 与化学合成 GK1 具有相同的抗菌活性, 对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的 MIC 均为 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对大肠杆菌 ATCC25922 的 MIC 均为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对绿脓杆菌 ATCC15442 的 MIC 分别为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 抗菌活性明显优于 Cecropin A(表 2)。

表 2 3 种抗菌肽对 3 种细菌的最小抑菌浓度(MIC)
Table 2 MICs ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of three antimicrobial peptides on three strains of bacteria

Antimicrobial peptides	Strains		
	1	2	3
recombinant GK1	0.25	2	10
synthetic GK1	0.25	2	8
Cecropin A	25	25	>50

1: *Staphylococcus aureus* ATCC25923; 2: *Escherichia coli* ATCC25922; 3: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442.

3 讨论

病原菌耐药性的日趋严重, 迫切需要开发新型的抗菌药物。抗菌肽具有独特的作用机理和高效、广谱的抗菌活性, 因而具有很好的应用前景, 但从天然资源中提取的抗菌肽非常有限, 而化学合成的抗菌肽成本又太高, 都不能满足实际需求, 因此研究利用基因工程技术低成本、大规模制备抗菌肽具有重要意义。

抗菌肽 GK1 不含二硫键且没有糖基化位点, 二级结构以 α -螺旋为主, 因此选择大肠杆菌表达系统最为经济。目前报道抗菌肽的融合载体蛋白有大肠杆菌的 RepA 蛋白^[11]、大肠杆菌 PurF 蛋白的 F4 片段^[13]、GST(谷胱甘肽)^[15]和 Trx(硫氧还原蛋白)^[16]等,

这些融合载体蛋白虽都能用于抗菌肽的表达, 但是存在表达效率低、相对表达量不高或者融合蛋白不易被裂解等问题。Kim 等^[19]在大肠杆菌中用一段酸性氨基酸成功地融合表达了抗菌肽 lactoferricin, 当我们直接在 GK1 前加上酸性氨基酸进行表达时, 构建的表达工程菌生长十分缓慢, 目的产物极其微量, 这可能是由于这样的融合表达方式会有部分可溶性表达, 因而对宿主菌产生了致命影响。

为了使具有高抗菌活性的 GK1 完全以包涵体形式表达, 我们将富含酸性氨基酸并且在大肠杆菌中以稳定包涵体形式表达的人胰岛素原作为融合载体蛋白, 人胰岛素原和 GK1 的融合基因在大肠杆菌中获得了高效表达。实验发现, 由于 IPTG 诱导后工程菌生长缓慢, 最终生物量较低, 因此适当提高诱导时细菌的 OD_{600} 值, 可以明显提高融合蛋白的表达量。在摸索包涵体后处理工艺过程中发现, 参照文献^[19]的方法, 采用 70%的甲酸溶解包涵体, 融合蛋白不能被 CNBr 裂解, 提示所形成的 mhPI-GK 融合蛋白包涵体较稳定。此外, 融合蛋白经 CNBr 裂解后的样品直接进行体外抑菌实验, 抗菌活性明显低于经过纯化后的重组 GK1, 说明带负电荷的人胰岛素原对 GK1 起到了一定的抑制作用, 从而降低了对宿主菌的毒性。

在本实验中, 诱导表达的融合蛋白经 CNBr 裂解、阳离子交换层析及 HPLC 纯化, 每升发酵液得到了 5.7 mg 纯度大于 97%的重组 GK1, 纯化后的重组 GK1 和化学合成 GK1 具有相同的抗菌活性。本基因工程制备方法工艺简单, 回收率高, 无需复性操作, 适合大规模生产。在下一步工作中, 将通过构建多拷贝表达载体以及工程菌的大规模发酵来进一步提高表达效率, 以获得更高的产量。

REFERENCES

- [1] Hoffmann JA. Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol*, 1995, 7(1): 4-10.
- [2] Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13: 61-92.
- [3] Hancock REW, Chapple DS. Peptide Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(6): 1317-1323.
- [4] Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(9): 710-720.
- [5] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002, 415(6870): 389-395.

- [6] Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res*, 2005, **30**(7): 505–515.
- [7] Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, *et al.* Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 1981, **292**(5820): 246–248.
- [8] Li GD, Qian CJ, Lu M, *et al.* A group of synthetic antimicrobial peptides. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, **46**(3): 492–495.
李国栋, 钱承军, 陆敏, 等. 一组人工合成抗菌肽的研究. *微生物学报*, 2006, **46**(3): 492–495.
- [9] Jiang LH, Lu HR, Huang DX, *et al.* Expression of porcine β -defensin 1 gene in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, **22**(6): 1036–1039.
姜丽华, 卢海蓉, 黄德新, 等. 猪 防御素 1 基因在毕赤酵母中的分泌表达. *生物工程学报*, 2006, **22**(6): 1036–1039.
- [10] Nie DS, Zhou YK, Cao ZY, *et al.* The analysis of heterogeneity of HWTX-I expressed in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, **22**(2): 215–219.
聂东宋, 周延凯, 曹佐英, 等. 毕赤酵母表达 HWTX-I 的不均一性分析. *生物工程学报*, 2006, **22**(2): 215–219.
- [11] Zhang L, Falla T, Wu M, *et al.* Determinants of recombinant production of antimicrobial cationic peptides and creation of peptide variants in bacteria. *Biochem Biophys Res Comm*, 1998, **247** (3): 674–680.
- [12] Rao XC, Li S, Hu JC, *et al.* A novel carrier molecule for high-level expression of peptide antibiotics in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2004, **36**(1): 11–18.
- [13] Lee JH, Kim JH, Hwang SW, *et al.* High-level expression of antimicrobial peptide mediated by a fusion partner reinforcing formation of inclusion bodies. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **277**(3): 575–580.
- [14] Wei Q, Kim YS, Seo JH, *et al.* Facilitation of expression and purification of an antimicrobial peptide by fusion with baculoviral polyhedrin in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(9): 5038–5043.
- [15] Feng XJ, Wang JH, Shan AS, *et al.* Fusion expression of bovine lactoferricin in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2006, **47**(1): 110–117.
- [16] Barrell PJ, Liew OW, Conner AJ. Expressing an antibacterial protein in bacteria for raising antibodies. *Protein Expr Purif*, 2004, **33**(11): 153–159.
- [17] Lee SY, Oh SJ, Kim CK, *et al.* Plasmids expressing human insulin and the preparation method for human insuling thereby. US patent Application, Publication Number: 20060035316, 2006-02-16.
- [18] Park IY, Park CB, Kim MS, *et al.* Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilunus asotus*. *FEBS Lett*, 1998, **437**(3): 258–262.
- [19] Kim HK, Chun DS, Kim JS, *et al.* Expression of the cationic antimicrobial peptide lactoferricin fused with the anionic peptide in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **72**(2): 330–338.

加强蓝藻的研究

蓝藻属原核生物一大类, 也有研究者把它列为蓝细菌(*Cyanobacterium*), 它与人类的关系非常密切, 既有有益的一面, 又有有害的一面。所谓害者, 比如人们熟悉的造成湖泊水域“水华”的发生。它的疯长与繁衍, 一是毒素蓝藻“水华”造成水域缺氧环境, 使水产生生物窒息而死; 二是产毒素蓝藻, 常见的有危害最重的微囊藻(*Microcystis aeruginosa*); 还有鱼腥藻(如 *Anabaena circinalis* 及 *A. flosaquae*)、节球藻(*Nodularia*)、鞘丝藻(*Lyngbya*)、水华束丝藻(*Aphanizomenon flosaquae*)、颤藻(*Oscillatoria*)等一些种类; 三是水华藻体分解后产生大量恶臭有机物, 污染环境。这一切会造成家畜、家禽、野生动物、鱼类等中毒致死, 同时也给居民生活带来危害。为彻底解决有害水华蓝藻的问题, 可以从以下几方面考虑: (1)首先要解决水环境富营养化即氮、磷等的污水流入问题。有关部门需采取综合防治措施, 以防止污水流入, 避免“水华”爆发。(2)就有害蓝藻本身而言, 一是对产毒素蓝藻产毒产品和产毒机制作进一步研究, 索取毒素产品以服务于民。二是从生物拮抗关系考虑其应用性。凡是有产毒素蓝藻存在的地方, 必定有吞噬该藻的微生物存在, 如噬藻体(病毒)和噬藻蛭弧菌的存在, 还需要做进一步探究。三是通过现代生物技术改造有害蓝藻。例如通过基因工程技术将灭蚊毒蛋白基因(源于细菌)引入水藻(如蓝藻中的鱼腥藻)构建“工程蓝藻”而获得灭蚊蛋白有效表达, 有可能成为获得高效灭蚊的重要手段。

至于有益的蓝细菌则较为普遍。如人们熟悉的螺旋藻藻蓝蛋白, 据称此蛋白有抗癌、抗辐射和促进造血功能等作用, 有研究表明, 基因重组藻蓝蛋白具有抗癌作用。再提一个与温室效应有关的实例, 在蓝藻中最常见的海洋蓝细菌如 *Prochlorococcus marinus* 和 *Synechococcus marinus*, 它们在海洋中的光合作用占总量的大约 1/2, 也就是说, 地球上的光合作用总量的 1/4 是它们的功劳, 每年从空气中清除约 100 亿吨碳, 为减少大气中 CO₂ 含量、减轻温室效应作出了重大贡献, 不可小视。

总之, 不论有毒的或是无毒的蓝藻都是重要的生物资源, 我们要充分利用其有效成分和特定功能, 去害取益, 更大地发挥其作用, 造福于人类。

(柯 为)