

果蝇抗菌肽基因(*Andropin*)的原核表达与活性分析

刘变芳^a, 郭蔼光^b, 金伟波^b, 范三红^b

(西北农林科技大学 a 食品科学与工程学院, b 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 【目的】克隆果蝇抗菌肽 *Andropin* 基因,以期利用原核表达系统生产高活性抗菌肽。【方法】首先化学合成了目的基因的 2 个片段和 1 对引物,然后利用重叠区互补 PCR 法得到抗菌肽 *Andropin* 的全基因序列。构建了融合表达载体 pET32a-Anp,并转入感受态细胞 OrigammiB 进行原核融合表达。重组菌株诱导表达后,用 His-Tag Purification kit 亲和层析柱纯化融合蛋白,纯化的蛋白用肠激酶切割并进行活性分析。【结果】在诱导温度 37 ℃、1 mmol/L IPTG 诱导培养 4 h 的条件下,可获得高效表达的融合蛋白;融合蛋白的表达量占总蛋白的 30%,分子量约为 28 ku,可溶性达 70%以上;抗菌活性试验表明,表达产物对大肠杆菌 and 金黄色葡萄球菌均有抑制作用。【结论】重组工程菌表达得到 *Andropin* 的融合抗菌肽,且其具有抗菌生物学活性。

【关键词】 果蝇;抗菌肽;基因融合表达;大肠杆菌;抗菌活性

【中图分类号】 Q786

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)07-0209-07

Prokaryotic expression and activity analysis of drosophila *Andropin* gene

LIU Bian-fang^a, GUO Ai-guang^b, JIN Wei-bo^b, FAN San-hong^b

(a College of Food Science and Engineering, b College of Life Science, Northwest A&F University,
Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 In this study, the *andropin* gene of *Drosophila* was cloned into *Escherichia coli* to produce high activity antibacterial peptide by prokaryotic expression system. 【Method】 Two sequences and a pair of primers of the *Drosophila Andropin* gene were designed and synthesized by chemical method and the whole *Andropin* sequence was obtained by complementary overlay area PCR method. A recombination fusion expressing vector pET32a-Anp was constructed and transformed into an *E. coli* host named OrigammiB. The expressed recombinant protein was purified by His-tag Purification kit, digested by enterokinase, and then its antibacterial activity was tested by agar diffusion assay. 【Result】 The result showed that the *Andropin* was expressed as a fusion protein in a 70% soluble form with a theoretical molecular weight of 28 ku. Following induction under the condition of 1 mmol/L IPTG for 4 h at 37 ℃, the high-level expression of the fusion protein can be achieved and the amount of the fusion protein reached 30% of the total proteins. The activity assay demonstrated that the peptide had active ability against the *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. 【Conclusion】 The recombinant engineered bacteria expressed the *Andropin* fusion peptide and activity assay demonstrated that the peptide had antibacterial biological activity.

Key words: *Drosophila*; antibacterial peptide; gene fusion expression; *E. coli*; antibacterial activity

抗菌肽是普遍存在于各种生物体中的具有广谱 抗菌活性的阳离子小分子多肽,对细菌、病毒及肿瘤

* [收稿日期] 2009-11-10

[作者简介] 刘变芳(1975—),女,陕西西安人,讲师,在读博士,主要从事食品微生物学及分子生物学研究。

[通信作者] 郭蔼光(1942—),女,陕西西安人,教授,博士生导师,主要从事生物化学及分子生物学研究。

细胞均有杀灭或抑制作用,是生物体天然免疫防御系统的一部分^[1-2]。根据多肽抗生素的结构可将其大致分为 4 类:杀菌肽(Cecropin),富含 Pro 残基的蛙皮素(Magainin),富含 gly 残基的蜂毒素(Melitin)及富含 Cys 残基的防御素(Defensin)^[3]。果蝇的 *Andropin* 基因邻近 *Ceropin* 基因簇,成熟的 *Andropin* 含有 34 个氨基酸残基,位于含 23 个氨基酸残基信号肽的旁侧,其结构与 *Ceropin* 相似,故属于杀菌素的一种^[4-5]。

大多数多肽抗生素都具有抗细菌的作用。目前,杀菌肽、蛙皮素、防御素等许多可形成双亲螺旋结构的多肽抗生素,是通过作用于细菌的细胞膜并在膜上形成离子通道,继而引起胞内物质的外漏而杀死细菌的,所以相对于传统的抗生素药物,微生物不易对抗菌肽产生抗性^[6]。从生物体内分离抗菌肽不仅步骤繁琐、产率较低,而且需要一些特殊的设备,导致合成抗菌肽的价格相当昂贵。利用基因工程的方法生产多肽抗生素,是降低生产成本的一条有效途径,但是多肽抗生素对原核细胞的毒性在一定程度上限制了其在原核表达系统中的应用^[7-8]。而真核表达系统的较低表达效率也是其工业化生产的一个障碍。为了克服多肽抗生素对细菌细胞的毒性,人们多采用融合表达或选择对多肽抗生素具有抗性的株系进行原核表达^[9-10]。本研究基于抗菌肽结构与功能的关系及前人所做的融合基因工作,设计、合成并原核融合表达了大小为 34 个氨基酸的果蝇抗菌肽(*Andropin*),并对其抗菌活性进行了研究,以为抗菌肽的生产表达、结构与功能研究及新型抗菌肽的设计提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株与质粒 受体菌株 JM109 和 OrigamiB 由西北农林科技大学生命学院分子生物学实验室保存,测试菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)该由该实验室保藏。克隆载体 pGEM-T Easy 和融合表达载体 pET32a 均为 Promega 公司产品。

1.1.2 酶和试剂 质粒提取试剂盒、IPTG、X-gal、抗生素、甘氨酸、Tris-base 和透析袋,均购自上海生物工程技术有限公司;PCR 试剂盒、*Taq* DNA Polymerase、*T₄* DNA 连接酶、*EcoR* I、*Hind* III、DNA Marker DGL2000,购自大连宝生物工程有限公司;低分子量标准蛋白,购自上海博亚生物技术有限公

司;凝胶回收试剂盒,购自 U Gene 公司;His-tag Purification kit,购自 Novagen 公司;肠激酶,购自深圳勤宝生物公司。

1.2 *Andropin* 基因序列及引物的设计与合成

参考 NCBI GenBank(Accession No. X56726) 中的 *Drosophila melanogaster Andropin* (Anp)成熟肽氨基酸序列,考虑 *E. coli* 偏爱密码子,设计出目的片段 *Andropin* 基因序列,并设计酶切位点。将整个 *Andropin* 基因分成含 10 个互补碱基的 2 个片段,同时根据已知核酸序列设计正负引物,送由上海博亚生物技术有限公司分别合成 2 个片段和 1 对引物^[11-12],其序列如下:

Sequence 1 (S1):CTA GAATTCGATGACGACGACAAGATCTTTGTGGATGTGCTGGATAACGTGGAAACCGCGCTGCATAACGCGGCCAAAGCGGGCTTTAAACTGA TTAAACCGAT;

Sequence 2 (S2):GTG AAGCTTATTATTTCGGCATAATCAGTTTTTCGATCGGTTTA ATCAGTTTAA。

Primer 5'(P1):CTA GAATTCGATGACGACGAC;

Primer 3'(P2):GTG AAGCTTATTATTTCGGC。

序列中引入限制性内切酶位点 *EcoR* I 和 *Hind* III, S1 和 S2 序列含有 10 个碱基的互补区(下划线标出部分)。

1.3 重叠区互补 PCR 法扩增完整目的片段

1.3.1 PCR 扩增条件的优化 将合成的目的基因片段(S1、S2)及其正负引物(P1、P2)进行稀释后分装备用,其中 P1 和 P2 浓度均为 5 $\mu\text{mol/L}$, S1 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$, S2 浓度为 1.9 $\mu\text{mol/L}$ 。设计 2 种 PCR 方法:① 2 个片段(S1、S2)和 1 对引物(P1、P2)同时加入进行 PCR 反应,反应 32 个循环。② 先加 2 个片段 S1 和 S2, PCR 反应 6 个循环后,再补加 1 对引物 P1、P2,继续 PCR 反应 32 个循环。以上 2 种 PCR 方法均在 25 和 50 μL 反应体系中进行反应,其中 25 μL 反应体系中 P1、P2 均加入 0.5 μL , S1 加 0.95 μL , S2 加 0.5 μL , 2 $\times$ Mastermix 12.5 μL , ddH₂O 补足 25 μL 。50 μL 反应体系各试剂量加倍。反应条件均为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 150 s, 36 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。终止反应,扩增产物于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.2 PCR 扩增产物的检测与回收 PCR 反应完成后,取扩增样品 3 μL 于 10 g/L 琼脂糖凝胶上电

泳,EB染色,紫外灯下观察电泳结果。在紫外灯下切下目的条带,参照胶回收试剂盒说明书,用DNA快速纯化试剂盒回收PCR产物。

1.4 目的片段的克隆与测序

回收产物经浓度测定后,采用T-A互补法进行PCR产物直接分子克隆,与克隆载体pGEM-Easy按5:1的物质的量之比加入连接体系。10 μ L连接体系中,PCR产物3.5 μ L,pGEM-T Easy载体0.5 μ L,Buffer 5 μ L, T_4 DNA连接酶1 μ L,16 $^{\circ}$ C连接16 h。连接产物转化感受态细胞JM109,Amp做筛选标记涂平板。37 $^{\circ}$ C培养过夜,挑取单菌落提取质粒并进行PCR检测,初步确定重组质粒连接正确后,送上海生工测序。

1.5 表达载体的构建

用质粒提取试剂盒提取质粒pET32a,用EcoR I和Hind III 2种酶对质粒进行双酶切。反应体系20 μ L:Hind III 1 μ L,EcoR I 1 μ L,M Buffer 2 μ L,质粒9 μ L,ddH₂O补足20 μ L。37 $^{\circ}$ C酶切4 h。酶切产物用10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测并回收片段,通过凝胶回收试剂盒回收双酶切大片段。对连接了目的片段的pGEM-T-Anp重组克隆载体同样进行上述双酶切,回收双酶切的目的小片段。对2种回收产物测定浓度后,将目的小片段与表达载体大片段以5:1的物质的量之比加入连接体系。10 μ L连接体系中,含目的片段3.5 μ L,表达载体大片段0.5 μ L,Buffer 5 μ L, T_4 DNA连接酶1 μ L,16 $^{\circ}$ C连接16 h。连接产物转化感受态细胞OrigammiB,用Amp做筛选标记涂板培养过夜,挑取单菌落,提取质粒并通过PCR和测序鉴定阳性克隆。

1.6 *Andropin* 基因的异丙基硫代- β 半乳糖苷诱导表达

将pET32a-Anp重组表达质粒转化到感受态OrigammiB宿主菌中,接种单菌落于含Amp(100 μ g/L)的LB液体培养基,37 $^{\circ}$ C培养过夜。取上述菌液以体积比1:100接种于新鲜的LB/Amp培养液中,37 $^{\circ}$ C振荡培养至OD₆₀₀为0.5~0.6,加1 mmol/L IPTG诱导培养后,12 000 r/min离心1 min,弃去上清液,沉淀用100 μ L SDS-PAGE上样缓冲液重悬,100 $^{\circ}$ C加热5 min,12 000 r/min离心3 min后,取上清液作为上样样品。设计诱导温度分别为25和37 $^{\circ}$ C,诱导时间分别为1,2,3,3.5和4 h,过夜培养,测定不同诱导条件下蛋白的表达量。

1.7 *Andropin* 融合蛋白的分离与纯化

1.7.1 包涵体和可溶性蛋白的测定 取100 mL

诱导培养物,10 000 r/min离心10 min,收集细胞并重悬于4 mL灭菌超纯水中。超声处理使包涵体沉淀,参数为:超声功率3 500 W,超声处理30 s,间歇30 s,重复10次。将超声波破碎的悬液于12 000 r/min离心30 min,分别取上清液和沉淀进行SDS-PAGE电泳检测。

1.7.2 表达产物的纯化 通过SDS-PAGE电泳检测确定表达产物可溶性蛋白含量达70%以上。将500 mL培养物诱导表达后,离心收集细胞于1 $\times$ binding Buffer中,超声波处理后收集上清液。用Novagen公司的His-tag Purification kit纯化蛋白,分段收集洗脱液,每管3 mL,具体操作步骤参照His-tag Purification kit说明书。纯化产物冷冻浓缩后进行SDS-PAGE电泳检测。

1.7.3 纯化产物的浓缩与透析脱盐 将纯化产物冷冻浓缩,由于其盐浓度过高,影响SDS-PAGE的电泳和进一步的蛋白酶切,故需要透析脱盐。透析脱盐所用透析袋(MWCO 10 ku)需要预处理,即用过量的10 mmol/L NaHCO₃溶液湿润并煮沸10 min,再用10 mmol/L Na₂EDTA煮5 min,然后用超纯水冲洗干净。用预处理后的透析袋盛装样品于烧杯中,用缓冲液透析,每2 h更换透析液1次。

1.8 *Andropin* 融合蛋白的肠激酶切及生物活性检测

1.8.1 融合蛋白的酶切 将纯化产物用重组肠激酶酶切,100 μ L反应体系中含10 $\times$ Buffer 10 μ L(0.2 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 7.4, 20 mmol/L CaCl₂,体积分数1% Tween-80),重组肠激酶1 μ L,待切蛋白溶液89 μ L,混匀后于20 $^{\circ}$ C反应12 h。

1.8.2 生物活性检测 利用琼脂扩散原理,采用滤纸片法测试透明圈,检测融合蛋白的生物活性^[13]。试验选择具有代表性的革兰氏阴性细菌大肠杆菌和革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌作为测试菌株。取100 μ L过夜培养菌液(约10⁸ cfu/mL)均匀涂布于琼脂平板上,室温下静置20 min备用。将浸泡于不同待检测样品中的滤纸片用小镊子夹取于涂菌的平板上,37 $^{\circ}$ C过夜培养,观察抑菌圈大小。

2 结果与分析

2.1 *Andropin* 基因的合成

由图1可见,采用化学合成法结合重叠区互补PCR扩增法,可得到144 bp左右的*Andropin*基因条带。图中1、2、3、5泳道均扩增到了144 bp左右

的条带,但条带较暗,而第 4 泳道 PCR 条带最亮。由此可以看出,PCR 采用 50 μ L 体系,先加 S1 和 S2 序列反应 6 个循环后,再加引物 P1 和 P2 反应 32 个循环,此为最佳扩增方法。

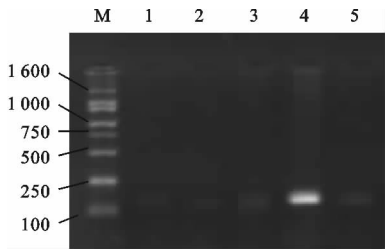


图 1 *Andropin* 基因片段的 PCR 扩增

M. Marker DL2000;1,2. 25 μ L PCR 反应体系;
3,4. 50 μ L PCR 反应体系;5. 阴性 PCR 对照;
1,3. 互补序列 S1、S2 和引物 P1、P2 同时加入,反应 32 个循环;
2,4. 先加互补序列 S1 和 S2 反应 6 个循环后,
再加引物 P1 和 P2 反应 32 个循环

Fig. 1 Amplification of *Andropin* gene by PCR

M. Marker DL2000;1,2. 25 μ L PCR reaction system;
3,4. 50 μ L PCR reaction system;5. Negative PCR control;
1,3. Added complementary sequences and primers together for
32 cycles;2,4. After reaction 6 cycles for complementary
sequences,added primers for reaction 32 cycles

2.2 *Andropin* 基因的克隆与测序

将 PCR 产物克隆到 pGEM-T Easy 载体上,转化宿主菌 JM109,Amp 筛选转化子,提取质粒进行 PCR 鉴定,结果见图 2。由图 2 可以看出,1~5 号转化子均扩增到约 144 bp 的 PCR 目的片段,故为阳性克隆,而 6 和 7 号转化子均为阴性克隆。将阳性克隆质粒送上海生物工程公司测序,结果表明,连接到 pGEM-T Easy 载体上的片段与设计合成的 *Andropin* 基因片段序列完全一致。

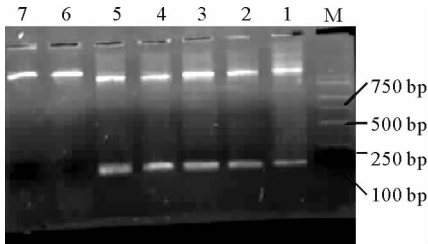


图 2 克隆重组载体 pGEM-T Easy-Anp 的 PCR 鉴定
M. Marker DL2000;1~7. PCR 产物(以转化子的质粒为模板)

Fig. 2 Identification of the recombination plasmid
pGEM-T Easy-Anp by PCR

M. Marker DL2000;1-7. Result of PCR (the plasmids
of transformant as template)

2.3 pET32a-Anp 融合表达载体的构建与测序

用 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切重组质粒 pGEM-T Easy-Anp,以 1.2 mg/L 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶回收试剂盒纯化回收 144 bp 目的基因片段,定向克隆到融合表达载体 pET32a 的 *Hind* III 和 *Eco*R I 位点上,构建成含 *Andropin* 基因的重组表达质粒 pET32a-Anp。用重组融合表达载体 pET32a-Anp 转化宿主菌 OrigammiB,在含氨苄青霉素的抗性平板上筛选转化子,提取阳生转化子的质粒,进行 PCR 鉴定并测序,PCR 鉴定结果见图 3。由图 3 可以看出,1~4 号转化子 PCR 均扩增到约 144 bp 的片段,进一步测序证明该片段与目的基因 *Andropin* 的序列一致。

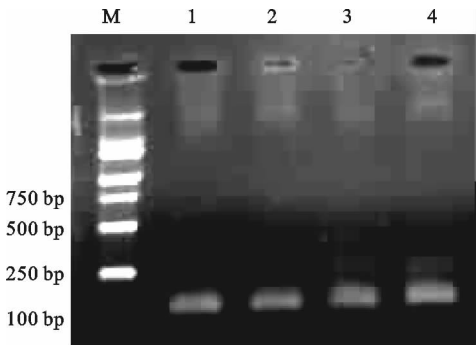


图 3 重组融合表达载体 pET32a-Anp 的 PCR 鉴定
M. Marker DL2000;1~4. PCR 产物(以阳性转化子为模板)

Fig. 3 Identification of the recombinant fusion
express vector pET32a-Anp

M. Marker DL2000;1-4. Result of PCR
(using the positive transformant as template)

2.4 *Andropin* 基因的融合表达结果

用氯化钙法将重组表达质粒 pET32a-Anp 转入受体菌株 OrigammiB 中,在含 Amp 的 LB 液体培养基中培养过夜,随后转接表达菌株并使其生长状态一致。处于对数生长期时加入诱导剂 IPTG,在不同的诱导温度和时间收获菌体,制备样品进行 SDS-PAGE 电泳,结果见图 4 和图 5。

图 4 为融合蛋白在不同温度下诱导表达 6 h 的电泳检测结果,可知 37 $^{\circ}$ C 下蛋白的表达量较 25 $^{\circ}$ C 高,其中以 37 $^{\circ}$ C 诱导培养的上清液中融合蛋白含量最高。用凝胶成像软件对图 4 进行分析,结果表明,融合蛋白表达量占总蛋白的 30%,可溶性达 70%以上。图 5 结果表明,37 $^{\circ}$ C 下诱导 1~4 h,随着诱导时间的延长,融合蛋白表达量提高;25 $^{\circ}$ C 低温诱导过夜培养,也可提高融合蛋白的表达量。

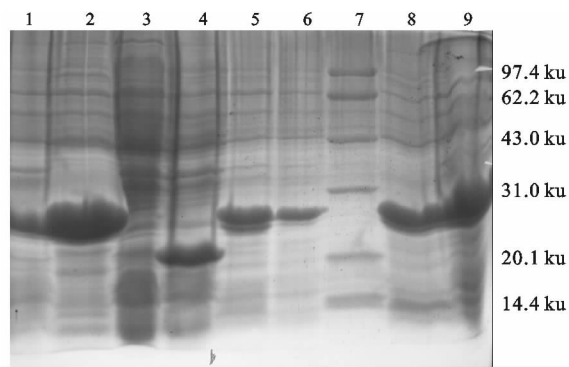


图 4 不同诱导温度下 Andropin 融合蛋白的诱导表达

1. 37 °C 诱导培养细胞沉淀物;2. 37 °C 诱导培养上清液;
3. OrigammiB 空菌株诱导培养物;4. pET32a 空质粒诱导培养物;
5. 25 °C 诱导培养物;6. 37 °C 诱导培养物;7. 低分子量蛋白 Marker;
8. 25 °C 诱导培养上清液;9. 25 °C 诱导培养沉淀物

Fig. 4 Induction and expression of fusion protein with different temperatures

1. The precipitate under 37 °C inducement;2. The supernatant under 37 °C inducement;3. Inducement of OrigammiB control;
4. Inducement of pET32a plasmid control;5. Inducement under 25 °C;6. Inducement under 37 °C;7. Protein molecular weight marker(Low);8. The supernatant under 25 °C inducement;9. The precipitate under 37 °C inducement

2.5 Andropin 融合蛋白的纯化

收获表达菌体,经超声波处理后,12 000 r/min 离心 30 min,收集上清液,用 His-tag Purification kit 纯化,收集抽提液,透析脱盐,冷冻浓缩后进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果见图 6。由图 6 可知,经 His-tag Purification kit 纯化后,可得到分子质量约为 28 ku 的融合表达蛋白。

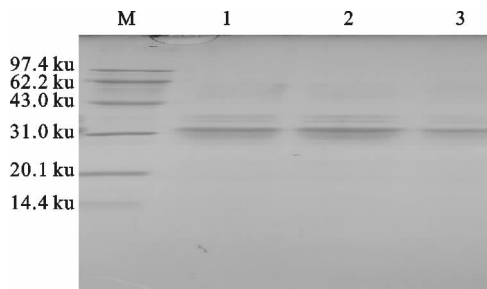


图 6 Andropin 融合蛋白的纯化结果

M. 低分子量蛋白 Marker;1~3. His-tag 纯化样品

Fig. 6 Result of fusion protein purification

M. Protein molecular weight Marker (Low);
1—3. The purified samples by His-tag

2.6 Andropin 生物活性的检测

试验分别采用清水、OrigammiB 宿主菌细胞破碎液、转化子细胞破碎液、抽提液和 Andropin 纯化

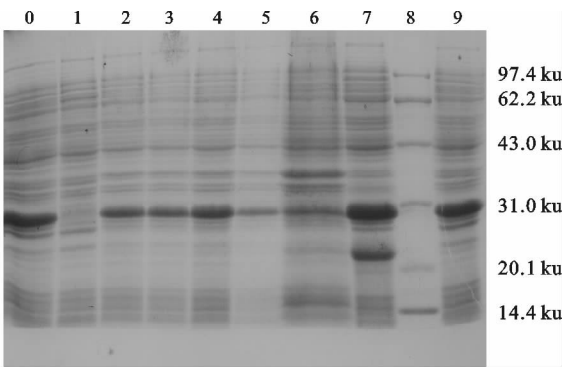


图 5 不同诱导时间下 Andropin 融合蛋白的表达

0,9. 25 °C 诱导过夜;1. 37 °C 诱导 1 h;2. 37 °C 诱导 4 h;
3. 37 °C 诱导 3.5 h;4. 37 °C 诱导 3 h;5. 37 °C 诱导 2 h;
6. 37 °C 诱导的沉淀;7. 37 °C 诱导的上清液;8. 低分子量蛋白 Marker

Fig. 5 Expression of fusion protein with different time

0,9. 25 °C inducement overnight;1. 37 °C inducement 1 h;
2. 37 °C inducement 4 h;3. 37 °C inducement 3.5 h;
4. 37 °C inducement 3 h;5. 37 °C inducement 2 h;
6. The precipitate of 37 °C inducement;
7. The supernatant of 37 °C inducement;
8. Protein molecular weight Marker (Low)

蛋白浓缩液进行抑菌效果比较,结果见图 7 和图 8。由图 7 和图 8 可见,纯化蛋白对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈远大于其他参照液,说明融合蛋白纯化后有明显的抗菌活性,而且对大肠杆菌的抗性比金黄色葡萄球菌强。

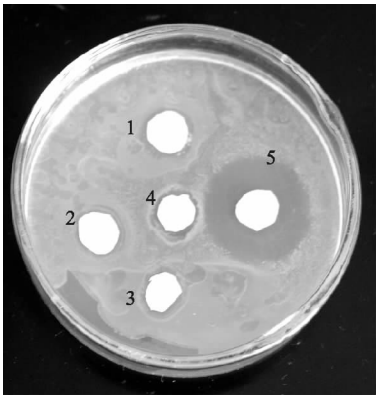


图 7 Andropin 对大肠杆菌的抑菌试验

1. 清水对照;2. OrigammiB 宿主菌细胞破碎液;
3. 转化子细胞破碎液;4. 抽提液对照;
5. Andropin 纯化蛋白浓缩液

Fig. 7 Andropin antibacterial test against *E. coli*

1. Water control;2. Broken liquid of OrigammiB cell;
3. Broken liquid of transformant;4. Purification reagent control;5. Concentrate of purified protein

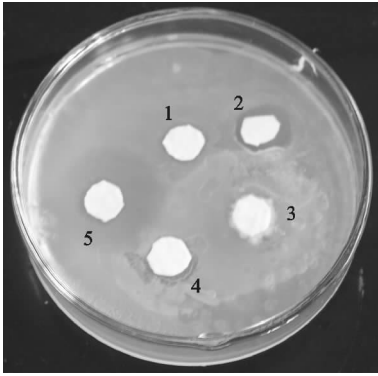


图 8 Andropin 对金黄色葡萄球菌的抑菌试验

- 1. 清水对照;2. OrigammiB 宿主菌细胞破碎液;
- 3. 转化子细胞破碎液;4. 抽提液对照;
- 5. Andropin 纯化蛋白浓缩液

Fig. 8 Andropin antibacterial test against *S. aureus*

- 1. Water control;2. Broken liquid of OrigammiB cell;
- 3. Broken liquid of transformant;4. Purification reagent control;5. Concentrate of purified protein

3 讨 论

抗菌肽的结构与活性有关,这为抗菌肽的分子设计提供了理论依据^[14]。基因序列设计时不仅要考虑抗菌肽活性的提高,而且还需考虑无干扰的重复序列和互补序列,同时限制性酶切位点的设置与消除也很重要。本试验为了使目标蛋白中不含外来载体中的片段残基,除了在基因的两端设计了便于在载体上克隆操作的酶切位点外,还在基因序列前引入了便于蛋白酶切纯化的肠激酶位点。另外,本试验采用基因片段重叠区互补扩增法合成 *Andropin* 基因,降低了试验成本,且快速、准确。

抗菌肽本身具有很强的抗菌作用,其基因在细菌中直接表达,容易造成宿主菌的自杀效应;而用真核宿主酵母系统表达,虽然可以直接获得有活性的抗菌肽,但所要求的条件较高且产量较低,所以本试验根据实验室的条件选择大肠杆菌作为表达系统^[15]。受体菌株选用 Novagen 公司的 OrigammiB,该菌株是硫氧还蛋白还原酶和谷胱甘肽还原酶双缺陷型,有利于目的蛋白胞内二硫键的形成,从而可以提高蛋白的可溶性及稳定性。本试验中选用了高效融合表达载体 pET32a 进行目的基因 *Andropin* 的融合表达。蛋白质融合表达有以下 3 个重要作用:①增加外源蛋白的稳定性;②提高外源基因在宿主中的表达水平;③有利于目的蛋白的分离纯化。pET 载体系列是用于蛋白高水平表达和纯化的一组表达载体,其外源基因表达受 T7 phage RNA 聚

合酶调控。将抗菌肽基因 *Andropin* 与 *EK* 基因融合,同时融合表达的还有 His. Tag 和 S. Tag,这些融合表达的标签为分离纯化融合蛋白提供了多种选择。

本试验对融合蛋白的诱导条件进行了研究,结果表明在 37℃、1 mmol/L IPTG 诱导培养 4 h 的条件下,可获得高效表达的 *Andropin* 融合蛋白。融合蛋白的表达量占总蛋白的 30%,可溶性达 70%以上。与周庆峰等^[15]对抗菌肽 Perinerin 融合表达的研究结果相比,本试验中 *Andropin* 融合蛋白的表达量占总蛋白的比例偏低,但可溶性提高了。为了提高融合蛋白的表达水平,本试验摸索了转基因大肠杆菌的最佳培养温度(37℃)、诱导时机(OD_{600} 为 0.5~0.6)、诱导剂 IPTG 终浓度(1 mmol/L)和菌体收集的方法(采用低温高速离心)等条件。

本研究的生物活性试验结果表明,表达产物抗菌肽对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌均具有一定的杀菌活性,但对大肠杆菌(革兰氏阴性菌)的抗性明显比金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌)强。今后还应与其他抗菌肽活性进行比较,并结合计算机软件辅助设计对抗菌肽片段进行基因改良,以寻求更为高效、高表达的抗菌肽基因。

[参考文献]

[1] Guerreiro C I,Fontes C M,Gama M,et al. *Escherichia coli* expression and purification of four antimicrobial peptides fused to a family 3 carbohydrate-binding module (CBM) from *Clostridium thermocellum* [J]. Protein Expr Purif, 2008, 59(1): 161-168.

[2] 王可洲,李浩,刘学玲,等,抗菌肽的分类及作用机理研究进展 [J]. 科学技术与工程, 2005, 5(7): 415-420.

Wang K Z, Li H, Liu X L, et al. The research progress of class and action mechanism of antibacterial peptides [J]. Science and Technology and Engineering, 2005, 5(7): 415-420. (in Chinese)

[3] 王学理,王兴隆,刘锴,等,抗菌肽的作用机制与应用 [J]. 动物医学进展, 2006, 27(9): 42-45.

Wang X L, Wang X L, Liu K, et al. The mechanism and application of antibacterial peptides [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2006, 27(9): 42-45. (in Chinese)

[4] 饶军华,周永富,阳建春. 果蝇免疫基因的表达 [J]. 昆虫天敌, 1996, 18(3): 141-146.

Rao J H, Zhou Y F, Yang J C. The expression of drosophila immunity gene [J]. Natural Enemies of Insects, 1996, 18(3): 141-146. (in Chinese)

[5] Samakoviis C, Kylsten P, Kimbrell D A, et al. The andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster* [J]. The EMBO Journal, 1991, 10(1): 163-169.

[6] 王金涛,李金龙,程广东,等,抗菌肽的作用机理及基因工程研究进展 [J]. 畜牧与兽医,2005,37(11):53-55.
Wang J T,Li J L,Cheng G D,et al. Progress of mechanism of action and genetic engineering of the antimicrobial peptides [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2005,37(11):53-55. (in Chinese)

[7] Tossi M,Scocchi M,Zanetti M,et al,An approach combining rapid cDNA amplification and chemical synthesis for the identification of novel, cathelicidin-derived, antimicrobial peptides [J]. Methods-Mol-Biol,1997,781:33-50.

[8] Kobayashi S,Takeshima K,Park C B,et al. Interactions of the novel antimicrobial peptide buforin 2 with lipid bilayers:proline as a translocation promoting factor [J]. Biochemistry,2000,39(29):8648-8654.

[9] Evans T C,Benner J,Xu M Q. The *in vitro* ligation of bacterially expressed proteins using an intein from methanobacterium thermoautotrophicum [J]. J Biol Chem,1999,274:3923-3926.

[10] Harder J,Bartels J,Christophers E,et al,Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic [J]. J Biol Chem,2001,276(8):5707-5713.

[11] Sambrook J,Fritsch E F,Maniatis T. 分子克隆 [M]. 2 版,金冬雁,黎孟枫,译. 北京:科学出版社,1995.
Sambrook J,Fritsch E F,Maniatis T. Molecular cloning [M]. 2nd Edition. Jin D Y, Li M F, translated. Beijing: Scientific Press,1995. (in Chinese)

[12] 桑春果,张开春,张军科. 重叠区扩增法合成抗菌肽基因 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2002,30(1):18-21.
Sang C G,Zhang K C,Zhang J K. Synthesis and cloning of anti-bacterial peptide B (cecropin B) gene by overlap extension [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition,2002,30(1):18-21. (in Chinese)

[13] Giacometi A,Cirioni O,DelPrete M S,et al. Combination studies between poly cationic peptides and clinically used antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria [J]. Peptides,2000,21(8):1155-1160.

[14] 刘琳,马延方,祝勇强,等. 抗菌肽的结构特征及其与活性关系 [J]. 药物生物技术,2008,15(1):64-67.
Liu L,Ma Y F,Zhu Y Q,et al,Structure of antibacterial peptides and their bioactivity [J]. Pharmaceutical Biotechnology,2008,15(1):64-67. (in Chinese)

[15] 周庆峰,李明月,李成伟,等. 新型抗菌肽 Perinerin 在大肠杆菌中的融合表达 [J]. 生物学杂志,2009,26(2):35-38.
Zhou Q F,Li M Y,Li C W,et al,The fusion expression of a novel antimicrobial peptide perinerin in *Escherichia coli* [J]. Journal of Biology,2009,26(2):35-38. (in Chinese)

(上接第 208 页)

[14] 乔勇,赵锦,杨海旭,等. 21 个枣品种(系)的 AFLP 指纹分析 [J]. 植物遗传资源学报,2009,10(2):205-210.
Qiao Y,Zhao J,Yang H X,et al. AFLP analysis on 21 cultivars and strains of Chinese Jujube [J]. Journal of Plant Genetic Resources,2009,10(2):205-210. (in Chinese)

[15] 韩远记,董美芳,袁王俊,等. 桂花品种资源的遗传多样性分析 [J]. 植物学通报,2008,25(5):559-564.
Han Y J,Dong M F,Yuan W J,et al. Study on the genetic diversity of *Osmanthus fragrans* cultivars [J]. Chinese Bulletin of Botany,2008,25(5):559-564. (in Chinese)

[16] 王玉良. 人参高产技术指南 [M]. 海口:南海出版公司,1989:296-297.
Wang Y L. Guidebook on *Panax ginseng* production [M]. Haikou: Nanhai Publishing House, 1989: 296-297. (in Chinese)

[17] 庄文庆. 药用植物育种学 [M]. 北京:农业出版社,1993:137-139.
Zhuang W Q. Medicinal plant breeding [M]. Beijing: Agriculture Publishing House,1993:137-139. (in Chinese)

[18] 戴思兰,陈俊愉. 中国菊属一些种的分支分类学研究 [J]. 武汉植物学研究,1997,15(1):27-34.
Dai S L,Chen J Y. A cladistic study on some *Dendranthema* SSP in China [J]. Journal of Wuhan Botanical Research,1997,15(1):27-34. (in Chinese)

[19] 李靖,程舟,杨晓伶,等. 人参农家类型遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药,2007,38(9):1392-1395.
Li J,Cheng Z,Yang X L,et al. ISSR analysis on genetic diversity of *Panax ginseng* landraces [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2007,38(9):1392-1395. (in Chinese)