

斜纹夜蛾 Cecropin D 成熟肽的原核表达及活性检测

宋杰¹, 陈维春^{2,*}

(1. 广东医学院寄生虫学教研室, 广东湛江 524023;

2. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东湛江 524023)

摘要: 采用 RT-PCR 方法从斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 脂肪体组织中扩增得到了 Cecropin D 成熟肽基因序列, 分析发现 Cecropin D 成熟肽与斜纹夜蛾 Cecropin B 之间存在 2 个氨基酸残基的差异。将获得的基因序列连接入原核表达载体 pGEX-4T-1, 并在原核细胞中实现了该蛋白的融合表达。SDS-PAGE 结果表明, 诱导后的宿主菌比未诱导菌中多出了一条融合蛋白表达带, 诱导后 1 h 就可以检测到该蛋白, 从诱导后 1 h 到 5 h 该蛋白在表达量上没有明显的差异。生长曲线显示在 IPTG 诱导后宿主菌的生长受到明显的抑制, 纯化后的蛋白对细菌具有一定的抑制作用。

关键词: 斜纹夜蛾; 抗菌肽; 融合表达

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2007)12-1207-05

Prokaryotic expression and antibacterial activity of Cecropin D from the common cutworm, *Spodoptera litura*

SONG Jie¹, CHEN Wei-Chun^{2,*} (1. Department of Parasitology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China; 2. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China)

Abstract: The gene sequence of Cecropin D mature peptide was obtained from the fat body of common cutworm, *Spodoptera litura* by RT-PCR. Amino acid sequence analysis showed that there was a two-amino-acid-residue difference between the mature peptides of Cecropin D and Cecropin B from *S. litura*. The target gene was cloned into a prokaryotic expression vector pGEX-4T-1, and a fusion protein was obtained from *E. coli* BL21 after IPTG induction; but no protein expression was detected without induction. The fusion protein could be detected 1 h after IPTG induction, and the amount of the fusion protein kept a relatively constant level from 1 h to 5 h. Growth curve showed that the growth of host bacteria with recombinant vector was restrained distinctly when IPTG was added into the culture medium. The results indicated that the purified fusion protein could restrain growth of bacteria.

Key words: *Spodoptera litura*; antibacterial peptide; fusion expression

昆虫拥有高效、可诱导的免疫体系。昆虫体表创伤或受到细菌感染后能够产生一系列的抗菌肽如天蚕素(cecropin)、防御素(defensin)、攻击素(attacin)和溶菌酶(lysozyme)等(Boman and Hultmark, 1987)。Cecropin 有较广的杀菌谱, 对多种革兰氏阳性和阴性菌均有效, 尤其对耐药菌株抗菌效果更佳, 在一些昆虫中被认为主要针对细菌起作用。Cecropin 分子包含 35~37 个氨基酸残基, 含有 2 段 α -螺旋, 中间由一段结节部位相连, 氨基末端经常是一些强碱性

氨基酸残基, 羧基末端则经常由非极性氨基酸残基构成疏水性区域。天蚕素在鳞翅目和双翅目昆虫中均有发现(Cociancich *et al.*, 1994), 但在其他类群昆虫中还未发现。

抗菌肽的杀菌机理不同于一般的抗生素, 普遍认为抗菌肽是通过静电作用被吸引到膜表面, 然后疏水尾插入细胞膜中的疏水区域, 改变细菌膜的构象, 多个抗菌肽分子在细菌细胞膜上穿孔而形成离子通道, 造成细菌细胞膜破坏, 引起胞内物质的泄

基金项目: 广东医学院博士启动基金

作者简介: 宋杰, 女, 1979 年生, 硕士, 研究方向为寄生虫分子生物学

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 0759-2590509; E-mail: chenweichun@hotmail.com

收稿日期 Received: 2007-02-08; 接受日期 Accepted: 2007-10-24

露,导致细菌死亡(Christensen *et al.*, 1988)。这种特殊的杀菌机理使得细菌不易产生耐药性,有希望开发成为一类新型的多肽抗生素。国内外学者用各种方法表达了许多抗菌肽,使得抗菌肽基因工程研究成为一个比较活跃的领域。

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* Cecropin D 是我们新近发现的抗菌肽,Cecropin D 成熟肽与斜纹夜蛾 Cecropin B(Choi *et al.*, 2000)之间存在 2 个氨基酸残基的差异。本实验通过 RT-PCR 扩增出 Cecropin D 成熟肽基因序列,并在原核细胞中实现了该蛋白的融合表达。融合蛋白具有一定的抑菌活性。

1 材料和方法

1.1 昆虫、细菌和免疫

斜纹夜蛾由中山大学昆虫所养虫室人工饲料饲养;大肠杆菌 TG1、BL21(DE3)、DH5 α 和 K₁₂D₃₁ 以及金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 均由本室保存。4 龄斜纹夜蛾注射 5 μ L 大肠杆菌 DH5 α 和金黄色葡萄球菌混合液诱导 24 h 后用于总 RNA 提取。

1.2 试剂

限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I、T₄ DNA 连接酶、质粒 pMD18-T 载体、RNA PCR Kit 购自 TaKaRa 公司;Taq 酶购自上海博亚生物科技公司;TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司;DEPC 和饱和酚购自上海生物工程公司;质粒提取和胶回收试剂盒购自 Omega 公司;表达载体 pGEX-4T-1 为 Pharmacia 公司产品。其他为国产分析纯试剂。

1.3 PCR 引物的设计

参照 Choi 等(2000)报道的斜纹夜蛾 Cecropin 基因设计 1 对特异引物,Mat-P1:5'-GGATCCAGGTGG AAGGTCTTCAAG-3';Mat-P2:5'-CTCGAGTTACTTCCC CAGCGCCTTG-3',引物由上海博亚生物科技公司合成。

1.4 总 RNA 的提取

按照 TRIzol 试剂的操作说明进行。

1.5 RT-PCR

按 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver. 2.1 操作手册进行。

1.6 原核表达载体的构建及鉴定

扩增得到的斜纹夜蛾 Cecropin D 成熟肽基因片段先与 pMD18-T 载体相连,经酶切测序鉴定正确后,再将目的片段用 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切,产物进行胶回收,与同样双酶切和胶回收纯化的载体

pGEX-4T-1 相连,转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞,挑取重组转化子进行酶切鉴定,得到重组质粒 pGEX-cccD。

1.7 融合蛋白的诱导表达

将鉴定正确的重组质粒 pGEX-cccD 转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,挑取单菌落接种到含 Amp 的 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。次日按 1:100 转接到新鲜培养基中,至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 进行诱导,分别于诱导 1 h、3 h、5 h 后离心收集菌液进行 SDS-PAGE 检测。

1.8 SDS-PAGE

参照 Sambrook 和 Russell(2001)的方法进行。

1.9 抑菌实验

取含有质粒 pGEX-cccD 和 pGEX-4T-1 的大肠杆菌 BL21 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.5 时,加入 IPTG 进行诱导,同时设不诱导的作为对照。每隔 1 h 取样测 OD 值,各设 3 个重复,每重复测 3 次,取平均值绘制菌的生长曲线。

1.10 表达产物的抗菌活性检测

培养 2 L 含有质粒 pGEX-cccD 的大肠杆菌 BL21 IPTG 诱导表达 3 h,收集菌体,超声破碎,4 $^{\circ}$ C 30 000 r/min 离心 15 min,按谷胱甘肽 Sepharose 4B 操作说明书进行 GST 融合蛋白的柱纯化,产物用凝血酶酶切,酶切后的蛋白直接采用琼脂孔穴扩散法(陈海旭等,2002)测定抗菌活性,以大肠杆菌 K₁₂D₃₁ 为指示菌,以纯化的 GST 蛋白凝血酶酶切体系为对照。

2 结果与分析

2.1 斜纹夜蛾 Cecropin D 成熟肽基因的克隆及原核表达载体 pGEX-cccD 的构建

取免疫后的斜纹夜蛾脂肪体组织提取总 RNA,用特异性引物 Mat-P1 和 Mat-P2 进行 RT-PCR,扩增出 Cecropin D 基因成熟肽编码区 cDNA 序列,1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察到一条特异扩增带(结果未显示)。将该片段克隆到 pMD18-T 载体构建重组质粒 pMD18-cccD,经 PCR 筛选和酶切鉴定后测序,结果表明获得的 Cecropin D 成熟肽与预期相符,与斜纹夜蛾 Cecropin B、A 成熟肽(Choi *et al.*, 2000)分别存在 2 个和 6 个氨基酸残基的差异(图 1)。

将 Cecropin D 成熟肽基因从 pMD18-cccD 载体上酶切出来,克隆到表达载体 pGEX-4T-1,得到重组表达质粒 pGEX-cccD。用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切

S. litura Cec D RWKVFKKIEKMGGRNIRDGI IKAGPAVEVLGSAKALGK
S. litura Cec B -----V-----I-----
S. litura Cec A -----V--V-----IG--Q----

图 1 斜纹夜蛾 Cecropin 成熟肽序列比较

Fig. 1 Comparison of mature peptides of *Spodoptera litura* cecropins
 虚线代表与 Cecropin D 成熟肽相同的氨基酸残基。

The dashed lines indicated identical amino acids to Cecropin D mature peptide.

鉴定, 切出大小约为 120 bp 的目的条带和 4.9 kb 的载体条带(图 2)表明 Cecropin D 成熟肽基因正确连接到 pGEX-4T-1 载体上。

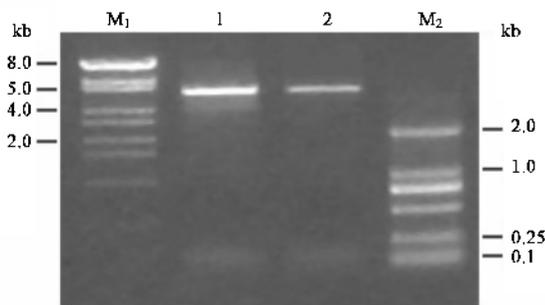


图 2 重组质粒 pGEX-cccD 的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction analysis of the recombinant plasmid pGEX-cccD

M₁: 1 kb 分子量标准 1 kb marker; M₂: DL2000 分子量标准 DL2000 marker; 1, 2: *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后的 pGEX-cccD 质粒 pGEX-cccD/*Bam*H I + *Xho* I.

2.2 融合蛋白的诱导表达及检测

将重组质粒 pGEX-cccD 转入表达菌株 BL21, 用 IPTG 诱导 1 h, 3 h, 5 h 后收集菌体, SDS-PAGE 检测结果表明含有重组质粒的菌株诱导后 1 h 就能检测到一条大小接近 33 kD 的蛋白带, 与预期大小相符, 而未诱导样品中没有该蛋白产生(图 3)。诱导 1 h, 3 h, 5 h 后的融合蛋白在表达量上没有明显的差异。

2.3 融合蛋白表达对细菌生长的影响

含有质粒 pGEX-cccD 和 pGEX-4T-1 的大肠杆菌 BL21 经 IPTG 诱导后的生长曲线如图 4。质粒 pGEX-cccD 诱导表达后细菌的生长受到明显的抑制, 诱导 1 h 后细菌的浓度稍稍有点下降, 随后逐渐上升, 诱导 5 h 后细菌浓度与未诱导组接近; 而质粒 pGEX-cccD 未经诱导组, 以及质粒 pGEX-4T-1 诱导组和未诱导组, 细菌生长基本不受 IPTG 影响, 开始保持对数生长期随后进入平台期。

2.4 Cecropin D 成熟肽的抗菌活性检测

Cecropin D 成熟肽在大肠杆菌 BL21 中与 GST 蛋白进行了融合表达, 柱纯化的重组蛋白经凝血酶酶

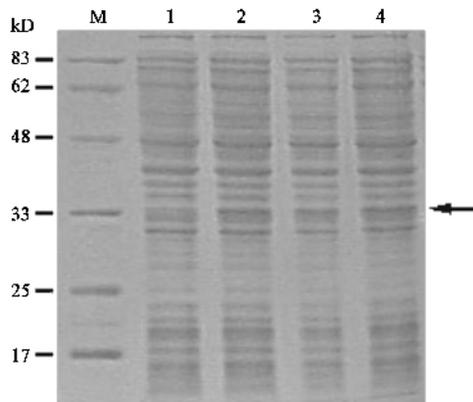


图 3 重组质粒 pGEX-cccD 在 BL21 菌株中的诱导表达

Fig. 3 Expression of the recombinant plasmid pGEX-cccD in BL21 induced by IPTG

M: 蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker; 1~4: 含质粒 pGEX-cccD 的大肠杆菌 BL21 经 IPTG 分别诱导 0 h, 1 h, 3 h, 5 h; 箭头指示重组蛋白 BL21 with pGEX-cccD induced 0 h, 1 h, 3 h, 5 h by IPTG. Arrowhead indicated the recombinant protein.

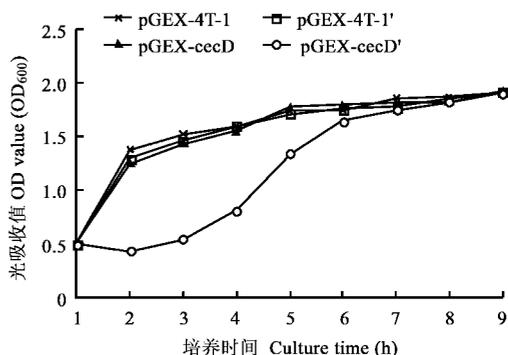


图 4 IPTG 诱导后含有 pGEX-cccD 和 pGEX-4T-1 质粒的 BL21 生长曲线

Fig. 4 Growth curve of BL21 with pGEX-cccD and pGEX-4T-1 induced by IPTG

pGEX-cccD, pGEX-4T-1: 未诱导样品 Not-induced samples; pGEX-cccD', pGEX-4T-1': 诱导后样品 Induced samples.

切取 20 μ L 酶切后的蛋白加入琼脂孔穴测定抗菌活性, 结果表明 Cecropin D 成熟肽对大肠杆菌 K₁₂D₃₁ 有明显的抑制作用, 在孔的边缘产生了清亮的抑菌圈, 而对照没有抑菌作用(图 5)。

3 讨论

细菌对常规抗生素的耐受性已经越来越强, 出现了许多耐药菌株(Davies, 1996), 开发新型抗生素显得特别重要(Hancock and Lehrer, 1998; Hancock, 1999)。抗菌肽具有特殊杀菌机理及良好的抗菌选择性, 能够杀灭对抗生素有耐受力耐药菌株, 且不会诱导产生新的耐药菌株, 这使得其在开发成肽类



图5 Cecropin D成熟肽抑菌作用

Fig. 5 Antibacterial effect of Cecropin D mature peptide

1: Cecropin D成熟肽 Cecropin D mature peptide;
2: GST蛋白 GST protein.

抗生素方面具有良好的应用前景。

目前抗菌肽的研究除了在各类物种中不断发现和纯化出新肽外,抗菌肽转基因研究和在多种表达系统进行高效表达也蓬勃开展。如将抗菌肽基因转到植物中增强对致病细菌和真菌的抗性(Oard and Enright, 2006);Imamura等(2006)则构建了带有Cecropin B-GFP报告基因的转基因家蚕。在表达方面则有了更多的报道。黄亚东等(2002)采用PCR技术改造了抗菌肽AD基因,将C末端改造为Asn,在毕赤酵母中实现了蛋白的高效表达;赵亚华等(2003)进行了进一步的改造使得改造后的抗菌肽AD杀菌效价提高了311倍。Jin等(2006)在毕赤酵母中表达并纯化了家蝇抗菌肽,发现接有 $6 \times \text{His}$ 的家蝇抗菌肽阳离子特性和稳定性都得到增强,并具有更强的杀菌活性。抗菌肽对细菌有杀伤作用,因而不适合在原核细胞中进行表达。但通过与其他接头或蛋白进行融合表达也有许多报道。朱嘉明等(2002)在大肠杆菌中表达了天蚕抗菌肽A的N端第1~7个氨基酸残基和蜂毒素N端第5~12个氨基酸残基组成的杂合。邱定红等(2002)构建人干扰素 $\alpha 1$ 和抗菌肽B的融合蛋白表达质粒,表达的蛋白抗病毒比活性为 2.62×10^6 IU/mg。Liang等(2006)也在大肠杆菌中表达了家蝇抗菌肽。

本研究克隆了斜纹夜蛾Cecropin D成熟肽基因序列,氨基酸残基序列比较发现Cecropin D成熟肽与Cecropin B、A成熟肽(Choi *et al.*, 2000)分别存在2个和6个氨基酸残基的差异,与家蚕等其他鳞翅目昆虫Cecropin也有一定的同源性(结果未显示)。将该基因克隆入原核表达载体pGEX-4T-1在大肠杆菌中进行融合表达,SDS-PAGE结果表明诱导后的宿主菌比未诱导菌中多出了一条融合蛋白表达带,诱导后1 h就可以检测到该蛋白,诱导后1~5 h该蛋

白在表达量上没有明显的差异。生长曲线显示在IPTG诱导后宿主菌的生长受到明显的抑制,而未诱导的菌和仅仅表达谷胱甘肽转移酶的细菌生长基本不受影响,表明该融合蛋白对细菌具有一定的毒性,该结果与李金耀等(2004)表达家蚕天蚕素的结果相类似。纯化表达的融合蛋白并用凝血酶酶切,得到Cecropin D成熟肽,抗菌活性检测初步结果表明该蛋白对大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$ 有明显的抑制作用,能够产生抑菌圈,对照GST蛋白则没有抑菌效果。有关蛋白的抑菌谱、效价分析等在进一步研究中。

致谢 本研究部分工作在中山大学昆虫研究所庞义教授实验室完成,在此致以诚挚的谢意。

参考文献 (References)

- Boman HG, Hultmark D, 1987. Cell-free immunity in insects. *Annu. Rev. Microbiol.*, 41: 103–126.
- Chen HX, Zou GY, Qu XM, Yang SL, 2002. Cloning and expression of antibacterial peptide Magainin in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 18(4): 461–464. [陈海旭, 邹冠玉, 屈贤铭, 杨胜利, 2002. 抗菌肽Magainin基因的克隆及其在*Pichia pastoris*中的表达. *中国生物化学与分子生物学报*, 18(4): 461–464]
- Choi CS, Lee IH, Kim E, Kim SI, Kim HR, 2000. Antibacterial properties and partial cDNA sequences of cecropin-like antibacterial peptides from the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 125: 287–297.
- Christensen B, Fink J, Merrifield RB, Mauzerall D, 1988. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(14): 5 072–5 076.
- Cociancich S, Bulet P, Hetru C, Hoffmann JA, 1994. The inducible antibacterial peptides of insects. *Parasitol. Today*, 10(4): 132–139.
- Davies J, 1996. Bacteria on the rampage. *Nature*, 383(6 597): 219–220.
- Hancock REW, 1999. Host defense (cationic) peptides: what is their future clinical potential? *Drugs*, 57: 469–473.
- Hancock REW, Lehrer R, 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.*, 16: 82–88.
- Huang YD, Zheng Q, Li XK, Yao RH, Huang ZR, 2002. Modification of Cecropin AD gene and its expression in *Pichia pastoris*. *Journal of South China University of Technology (Natural Science)*, 30(2): 13–16. [黄亚东, 郑青, 李校昆, 姚汝华, 黄自然, 2002. 抗菌肽AD基因的改造及在毕赤酵母中的表达. *华南理工大学学报(自然科学版)*, 30(2): 13–16]
- Imamura M, Nakahara Y, Kanda T, Tamura T, Taniai K, 2006. A transgenic silkworm expressing the immune-inducible cecropin B-GFP reporter gene. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36(5): 429–434.
- Jin F, Xu X, Zhang W, Gu D, 2006. Expression and characterization of a housefly cecropin gene in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*.

- Protein Exp. Purif.*, 4(1):39-46.
- Liang Y, Wang JX, Zhao XF, Du XJ, Xue JF, 2006. Molecular cloning and characterization of cecropin from the housefly (*Musca domestica*), and its expression in *Escherichia coli*. *Dev. Comp. Immunol.*, 30(3): 249-257.
- Li JY, Zhang FC, Ma ZH, 2004. Prokaryotic expression of cecropin gene isolated from the silkworm *Bombyx mori* Xinjiang race and antibacterial activity of fusion cecropin. *Acta Entomol. Sin.*, 47(3): 407-411. [李金耀, 张富春, 马正海, 2004. 家蚕天蚕素 cDNA 原核表达及抗菌活性检测. *昆虫学报*, 47(3): 407-411]
- Oard SV, Enright FM, 2006. Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Cell Rep.*, 25(6): 561-572.
- Qiu DH, Mao XH, Gao XD, Li XR, Lin BR, Xu H, 2002. Expression of a novel fusion gene *hFN α 1-CB* in *E. coli*. *Journal of China Pharmaceutical University*, 33(6): 521-525. [邱定红, 毛晓华, 高向东, 李新荣, 林碧蓉, 徐衢, 2002. 新型融合基因 *hFN α 1-CB* 在大肠杆菌中表达. *中国药科大学学报*, 33(6): 521-525]
- Sambrook J, Russell DW, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Zhao YH, Xu W, Cai JW, Hu K, Liao FP, Huang ZR, 2003. Research of the antibacterial activity increasing of Cecropin AD in *Pichia pastoris* expression. *China Biotechnology*, 23(8): 77-82. [赵亚华, 徐伟, 蔡家伟, 胡康, 廖富蘋, 黄自然, 2003. 改造后的抗菌肽 AD 基因在毕赤酵母中表达效价研究. *中国生物工程杂志*, 23(8): 77-82]
- Zhu JM, Liu FP, Li YQ, Zhong ZY, Zhang N, 2002. Cloning and expression of a gene encoding shortened Cecropin A-melittin hybrid in *E. coli*. *Hereditas*, 24(1): 31-34. [朱嘉明, 刘飞鹏, 李月琴, 钟振宇, 张娜, 2002. 天蚕抗菌肽 A 与蜂毒素杂合肽基因的合成及在大肠杆菌中的克隆与表达. *遗传*, 24(1): 31-34]

(责任编辑:黄玲巧)