

# 海洋生物抗菌肽在枯草杆菌 BS168 中的高效表达

谢海伟, 文冰, 王娣, 钱时权, 杨贤松, 许晖

(蚌埠学院 生物与食品工程系, 安徽 蚌埠 233030)

**摘要:** 为了实现基因工程高效制备 tachyplesin I, 采用 tachyplesin I 基因串联表达的方法, 以穿梭表达载体 pSBPTQ 为表达载体, 通过 RT-PCR 扩增 tachyplesin I 基因(*tac*)和采用直接退火的方法合成 tachyplesin I 串联基因(*2tac*), 构建重组表达载体 pSBPTQ-TAC 和 pSBPTQ-2TAC, 转化到枯草杆菌 BS168 实现高效表达。实验结果表明: 基因 *tac* 和 *2tac* 在枯草杆菌中表达成功, TAC 和 2TAC 抗菌肽表达量分别约为 8.5%、15.8%, 经高效液相色谱分析表达产物在发酵上清液中的含量约为 5.46、10.36 mg/L; 表达产物 TAC 和 2TAC 对大肠杆菌 K88 和金黄色葡萄球菌都具有明显的抑菌作用, 2TAC 经 BrCN 水解产物抑菌活力高于 TAC, 而 2TAC 的表达产量大约是 TAC 的 1.89 倍。这表明通过 tachyplesin I 串联表达产物降低了自身对宿主的毒性, 可以提高 tachyplesin I 的表达产量。

**关键词:** 抗菌肽 tachyplesin I; 表达载体构建; 串联表达; 抗菌活性

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2011)03-0055-09

马蹄蟹(*Horseshoe crab*)是一类远古的海洋节肢动物。马蹄蟹血细胞中分离提取的一类抗菌肽<sup>[1]</sup>, 具有抗细菌、抗真菌、抗病毒、抑制肿瘤细胞增殖和诱导癌细胞分化的生物活性<sup>[2]</sup>。抗菌肽 tachyplesin I 因相对分子质量小不具备抗原性, 对原核生物细胞有很高的杀菌活性, 对真核生物的正常细胞则无明显毒副作用。抗菌时一般没有特殊受体, 不会诱导抗药菌株的产生, 是一类具有巨大潜在应用价值的抗菌肽。但由于马蹄蟹是一种珍贵的海洋生物, 物种稀少, 是濒临灭绝生物, 且 tachyplesin I 的分离纯化过程繁琐且费用较高; 通过化学合成制备, 价格昂贵, 生物活性低; 因此采用基因工程制备 tachyplesin I 成为一种可行的方案<sup>[3]</sup>。

目前, 利用基因重组技术在体外大量制备活性多肽是生物制品研究的热点之一。对于分子质量较小的多肽, 如果用常规方法构建单拷贝基因的重组质粒, 则目的基因在细胞中的表达量很低, 无法体现基因工程产量高的优势。因此, 本文建立了一种构建串联基因的方法, 以实现小分子多肽在体外的高效表达, 为小肽的串联表达提供了理论和实践依据。本研究为了克服基因工程制备 tachyplesin I 的缺陷, 设计构建 tachyplesin I 基因串联表达载体, 并将重组基因成功转化到分泌型表达系统枯草杆菌 BS168 中, 实现了抗菌肽 tachyplesin I 的高效分泌表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

克隆宿主菌 *Escherichia coli*. DH5 $\alpha$ 、大肠杆菌 *E. coli* K88、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 为本室保存; 枯草杆菌 *Bacillus subtilis* BS168 为表达宿主菌, 由上海生命科学院植物生理与生态研究所惠赠; TA 克隆载体 pUCM-T 购自上海生工公司; 大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pSBPTQ<sup>[4]</sup>由中山大学罗进贤教授惠赠。

#### 1.1.2 培养基和主要试剂

马蹄蟹购自广东省深圳市水产品市场; 枯草杆菌感受态制备用 GMI、GMII 培养基<sup>[5]</sup>; 发酵用 MSR 培养基<sup>[6]</sup>。cDNA 合成试剂盒及各种工具酶均购自 TaKaRa 公司; Trizol reagent 购自 Invitrogen 公司; 蛋白分子质量标准、mRNA 纯化试剂盒购自

收稿日期: 2010-04-20; 修回日期: 2010-08-03

基金项目: 安徽省高校自然科学基金资助项目(KJ2009B014); 安徽省高等学校省级食品科学与工程特色专业建设点资助项目(20101091); 安徽省食品科学与工程教学团队项目资助(20101094); 蚌埠学院优秀人才基金项目及院级教育教学研究项目(JYLC1015); 高校省级优秀人才基金项目(2011SQRL166)

作者简介: 谢海伟(1978-), 男, 吉林桦甸人, 讲师, 博士, 主要从事多肽和酶工程方面研究, E-mail: xiehaiwei324@163.com

Promega 公司; CM Sepharose 购自 Amersham Biosciences; 其他生化试剂(分析纯)购自上海生工; 实

验中所用引物(由上海生工合成), 各引物设计如表 1 所示。

表 1 所用引物表  
Tab. 1 PCR primers

引物	碱基序列	用途
M13 Forward(-20)	5'-gtaaacgacggccag-3'	amplifying <i>2tac</i> gene from pUCM-2TAC
M13 Reverse(-48)	5'-caggaacagctatgac-3'	amplifying <i>2tac</i> gene from pUCM-2TAC
<i>Tac-1</i>	5'-gctctagagcaatctagacaaatgggtgcttccgtg-3'	amplifying <i>tac</i> gene
<i>Tac-2</i>	5'-ggggtaccaacacggcaacgacgg-3'	amplifying <i>tac</i> gene

## 1.2 方法

### 1.2.1 抗菌肽 tachypleins I 基因的 RT-PCR 扩增

从马蹄蟹围心腔采集血液, 8 000 r/min 离心 10 min 获得血细胞<sup>[7]</sup>, 用 Trizol 处理提取总 RNA, 以 mRNA 纯化试剂盒获得 mRNA。反转录合成 cDNA, 进一步以 cDNA 为模板, 参考 Genbank 收录的 tachyplein 基因序列, 设计了上下游引物 *Tac-1* 和 *Tac-2*, 见表 1。并设计了 *Xba* I 和 *Kpn* I 酶切位点和保护碱基。PCR 扩增获得的目的基因 *tac*, 经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 电泳检测后测序。

### 1.2.2 串联基因(2*tac*)的设计

参照 Genbank 上公布的基因序列, 设计合成两条完全互补单链 tachypleins I 串联基因, 5'端设计 *Xba* I 黏性末端, 3'端设计 *Kpn* I 黏性末端。通过上海生工公司合成带有上述黏性末端的完全互补的碱基序列, 退火合成带有黏性末端的双链串联 tachypleins I 基因。方法合成如下: 取等量摩尔浓度 25 μmol/L 的正反义引物各 4 μL, 添加超纯水至 40 μL。退火条件: 80℃水浴退火 5 min, 然后自然冷却至 30℃, 其过程大概 3 h。退火合成串联基因(2*tac*)克隆连接到 pUCM-T 上进行初步鉴定及目的串联基因的扩增。

2TAC 正义链:

5'-aaaaaGCTCTAGAGCAaaatgggtgcttccgtgttgctaccgtgtatctgctaccgtcgttgcgtaacATGaaatgggtcctcagatgctacaggggaattgttatcgcagatgtcgaacGGTACC-3'

2TAC 反义链:

5'-aaaaaaGGTACCgtttcgacatctgcgataacaaattcccctgtagcatactctgaagcaccatttCATgttacggcaacgacgtagcagataccacggtagcaaacacggaagcaccattttGCTCTAGAGC-3'

### 1.2.3 串联基因 2*tac* 的克隆鉴定及体外 PCR 扩增

克隆载体 pUCM-T 经限制性内切酶 *Xba* I 和 *Kpn* I 双酶切后, 和 tachyplein 基因 *tac* 及 2*tac* 经 T4 DNA 连接酶连接。转入大肠杆菌 DH5α 培养, 经过蓝白斑筛选得阳性克隆, 培养提取质粒。经双酶切

初步鉴定, 再通过测序进一步验证克隆片断的正确性。所得克隆质粒命名为 pUCM-2TAC 和 pUCM-TAC。

### 1.2.4 表达载体的构建及鉴定和重组质粒转化

以 pUCM-2TAC 质粒模板, 通过引物 M13 经 PCR 扩增得到串联基因 *2tac*, PCR 反应条件: 94℃预变性 10 min; 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共进行 35 个循环; 最后 72℃延伸 10 min。将 PCR 产物和表达载体 pSBPTQ 同时进行 *Xba* I 和 *Kpn* I 双酶切, T4 DNA 连接酶连接, 大肠杆菌转化按 Sambrook 的方法进行<sup>[8]</sup>。转化后筛选阳性克隆, 双酶切鉴定, 测序验证。所得质粒命名为 pSBPTQ-2TAC, 重组表达质粒 pSBPTQ-TAC 和 pSBPTQ-2TAC 转化枯草杆菌 BS168 的方法参照 Harwood<sup>[9]</sup> 方法进行。

### 1.2.5 诱导表达及 SDS-PAGE 电泳分析

挑取新鲜转化的枯草杆菌工程菌 BS168/pSBPTQ-TAC 和 BS168/pSBPTQ-2TAC 单菌落接种于含卡那霉素(10 mg/L)的 LB 培养基中, 37℃ 250 r/min 培养过夜, 作为种子液。然后种子液按 5%接种量转接于含卡那霉素(10 mg/L)的发酵培养基(MSR)中, 37℃ 250 r/min 振荡培养 2~4 h, 加蔗糖至终浓度 2% 诱导表达<sup>[10]</sup>, 每隔 12 h 依次取样, 收集的发酵液经 10 000 r/min 离心 15 min, 取发酵液上清进行 Tris-Tricine SDS-PAGE(16.5%)电泳检测, 以确定最佳诱导时间。用含质粒 pSBPTQ 的对照菌体和标准蛋白作对照。

### 1.2.6 重组 tachyplein I 的分离纯化

收集发酵液 12 000 r/min, 离心 15 min。向发酵上清液中依次加入硫酸铵使终浓度达到 35%、45%、55%、65%、75%, 12 000 r/min 离心 30 min, 收集沉淀, 用 pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液溶解沉淀。将盐析浓缩效果最好的溶液装入透析袋中进行透析。透析产物上 CM -Sepharose 层析柱, 用 10 mmol/L Tris-HCl

(pH6.8)平衡洗脱柱, 然后用相同缓冲溶液配制的 0~1.0 mol/L 的 NaCl 线性梯度洗脱(2 mL/min), 收集活性峰, 对收集样品经冷冻干燥浓缩, 用无菌水配得 tachypleins I 表达产物溶液 10 mL。参照谢海伟等<sup>[11]</sup>高效液相色谱方法检测 tachyplein I 表达产物含量。

### 1.2.7 Tachyplein I 串联表达产物 2TAC 的水解及活性检测

取两份各为 1.0 mL 冷冻干燥的串联表达产物 2TAC, 将其中一份溶于 1.0 mL BrCN 溶液(50 g/L, 70%甲酸配制)中, 另一份溶于仅含 70%甲酸溶液中, 同时置于 4 °C 冰箱水解处理 24 h, 水解后再加 1.0 mL 的双蒸 H<sub>2</sub>O, 冷冻干燥以除去甲酸和 BrCN, 干制品用无菌水重新配制成 1.0 mL 溶液进行活性检测。上述 2TAC 水解液产物进行活性鉴定, 以大肠杆菌 K88 和金黄色葡萄球菌为试验菌株, 分别取 5 mg/L 的 2TAC 和 TAC, 10 mg/L 的 2TAC 和 2TAC 水解产物, 以 BS168/pSBPTQ 空质粒菌株发酵液为对照, 参照微量肉汤稀释法<sup>[12]</sup>进行抗菌活性检测。同时以上述 TAC 对供试菌株孵育, 参照代建国等<sup>[13]</sup>建立方法进行透射电镜观察, 分析细胞微观结构的变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 Tachyplein I 串联基因(2tac)的设计

Tachyplein 串联基因的设计如图 1 所示, 在单 tachyplein 基因 *tac* 的 3'端添加“AAC”密码子, 目的为了使 tachyplein 基因表达产物 C 末端产生酰氨化结构, 两个 tachyplein 基因通过蛋氨酸密码子“ATG”连接, 目的在于增添表达产物的 BrCN 水解位点。为了便于和表达载体连接, 在串联基因的 5'端设计 *Xba*I 酶切位点黏性末端, 后加两个“AA”为使串联基因 *2tac* 在表达载体的正确阅读框内, 使其能正确表达, 其前加“AA”作为保护碱基。

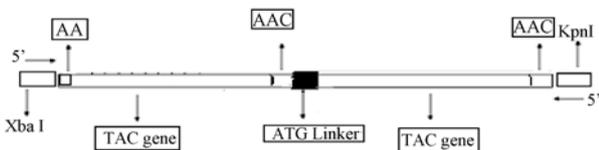


图 1 tachyplein I 串联基因 2tac 的设计

Fig. 1 Design of tandem gene of tachyplein

### 2.2 串联基因 2tac 重组表达载体的构建

将大肠杆菌质粒 pSP72 的复制起点及氨基青霉

素抗性基因转移到枯草杆菌质粒 pUB18 上构建了大肠杆菌-枯草杆菌穿梭型克隆载体 pSB。然后将枯草杆菌 *sacB* 基因的启动子-信号肽序列(*sacB P.S.*)及地衣芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶基因的转录终止信号 T(*amy T*)克隆进 pSB, 获得诱导型表达-分泌载体 pSBPT, 最后将短小芽孢杆菌正调控基因 *degQ* 引入 pSBPT, 获得重组质粒 pSBPTQ, 构建过程见图 2。含 *2tac* 基因的重组质粒的构建如图 3 所示, 将 pSBPTQ 用 *Xba*I /

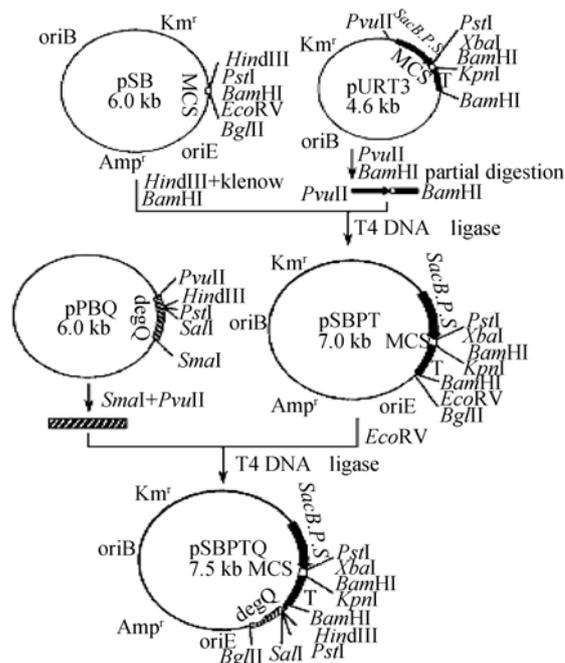


图 2 穿梭型诱导表达载体构建<sup>[4]</sup>

Fig. 2 The expression plasmid pSBPTQ

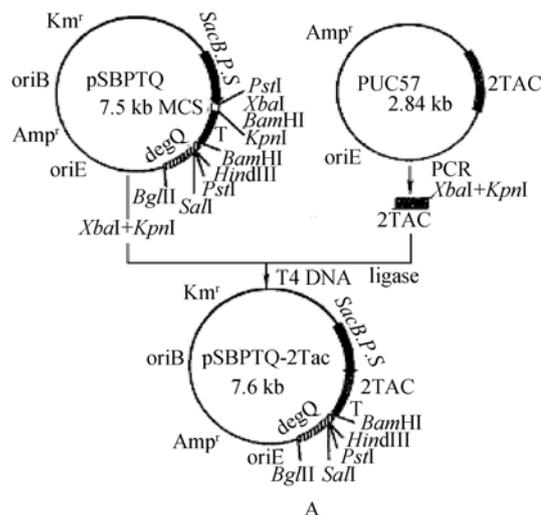


图 3 重组表达载体 pSBPTQ-2TAC 的构建

Fig. 3 The recombinant expression plasmid pSBPTQ-2TAC

*Kpn I* 双酶切, 电泳回收 7.5 kb 大片段, 与经 *Xba I* / *Kpn I* 酶切的 PCR 产物连接, 构建含 *2tac* 基因的重组质粒。

### 2.3 Tachyplesin I 基因(*tac*)的 RT-PCR 扩增以及电泳鉴定

从马蹄蟹细胞中提取总 RNA, 根据 tachyplesin I 基因序列设计的引物 *Tac-1* 和 *Tac-2*, 以马蹄蟹血细胞 cDNA 为模板扩增的 PCR 产物, 产物经凝胶电泳分析, 如图 4 所示。在泳道 2 中出现一条 70 bp 左右的 DNA 条带。采用退火法合成的串联基因 *2tac*, 经凝胶电泳分析, 在泳道 1 中出现一条 120 bp 左右 DNA 条带。初步证明获取了目的基因 *tac* 和 *2tac*。

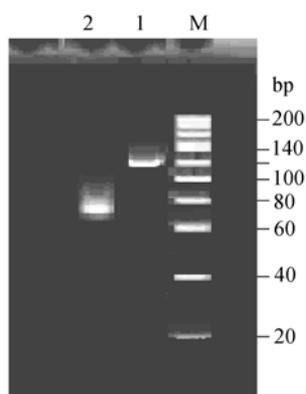


图 4 tachyplesin I 基因 *tac* 和 *2tac* 的 PCR 产物电泳图

Fig. 4 PCR product of *tac* gene and *2tac*

M. DNA 分子标准; 1. 退火生成的串联基因(*2tac*); 2. PCR 扩增的基因(*tac*)

M. DNA Marke; 1. *2tac* gene by annealing; 2. PCR product by RT-PCR

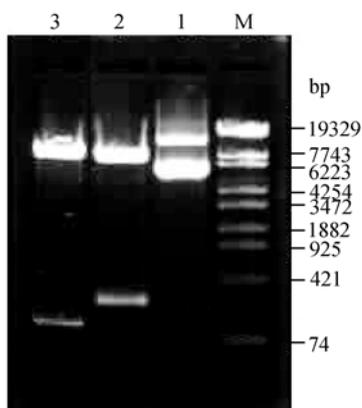


图 5 重组子 pSBPTQ-TAC 和 pSBPTQ-2TAC 的酶切鉴定  
Fig. 5 Restriction enzyme analysis of pSBPTQ-TAC and pSBPTQ-2TAC

M. DNA 分子标准; 1. 质粒 pSBPTQ; 2. 经双酶切的 pSBPTQ-2TAC; 3. 经双酶切的 pSBPTQ-TAC;

M. DNA Marker; 1. pSBPTQ; 2. pSBPTQ-2TAC/*Xba I*+*Kpn I*; 3. pSBPTQ-TAC/*Xba I*+*Kpn I*

### 2.4 重组表达载体的鉴定

重组质粒经过双酶切后凝胶电泳图见图 5, 结果显示在约 80 bp、150 bp 和 7.4 kb 处有预期的条带。初步证明目的基因 *tac* 和 *2tac* 已经克隆到表达载体上。重组子进行测序, 测序图谱如图 6,7 所示, 测序结果采用软件 CLUSTAL(1.81)进行克隆序列和已知 tachyplesin 基因序列进行比对分析。核苷酸序列比对结果, 重组子基因 *tac* 和 *2tac* 核苷酸序列和已知 tachyplesin 基因序列完全相同, 长度分为 56 bp、119 bp, 这表明 tachyplesin 基因 *tac* 和 *2tac* 成功克隆到 pSBPTQ 载体中, 通过测序图谱进一步表明, 目的基因连接顺序和启动子方向一致, 在表达载体的正确阅读框内, 重组子命名为 pSBPTQ-2TAC 和 pSBPTQ-TAC。

### 2.5 重组转化菌的诱导表达及 SDS-PAGE 鉴定

与对照 BS168/pSBPTQ 发酵液相比, 在重组子 BS168/pSBPTQ-2TAC 和 BS168/pSBPTQ-TAC 的电泳图中出现一条明显的蛋白条带, 如图 8 中箭头所指条带分别大小约为 2.0 KD 和 5.0 KD, 表达产物大小与天然 tachyplesin 多肽和其串联体的相对分子质量大小相符, 由此可以初步确认目的蛋白 2TAC 和 TAC 在宿主菌种得到了有效地表达, 并且分泌到发酵液中。采用凝胶成像系统分析软件 GeneTools 对 SDS-PAGE 电泳的结果进行分析, 对图 8 中 2,3 泳道进行扫描, 经峰面积积分计算出目的条带的吸收峰在所有表达蛋白的吸收峰中所占的百分含量, 即为目的蛋白在表达的全蛋白中的百分含量。本实验比较的是 TAC 和 2TAC 蛋白在全蛋白中的百分含量, 经 GeneTools 软件分析, 重组表达产物 TAC 和 2TAC 蛋白表达量分别约为 8.5%、15.8%。

工程菌株 *B. subtilis* BS168/pSBPTQ-2TAC 和 BS168/pSBPTQ-TAC, 经蔗糖诱导后, 每隔 12 h 取样进行 SDS-PAGE 电泳检测。由图 9 可以看出, 目的蛋白 2TAC 和 TAC 随着诱导时间的增加, 表达量也在增加, 当诱导 24 h 时, 表达产量达到最高值。

### 2.6 表达蛋白 2TAC 和 TAC 的分离纯化及 SDS-PAGE 鉴定

通过不同饱和浓度的硫酸铵对表达产物进行盐析初步纯化, 浓缩产物进行 MIC 检测, 目的蛋白沉淀量与硫酸铵浓度的关系见图 10 所示, 用 55%饱和度的硫酸铵处理后, 浓缩液抗菌活性最强, 用

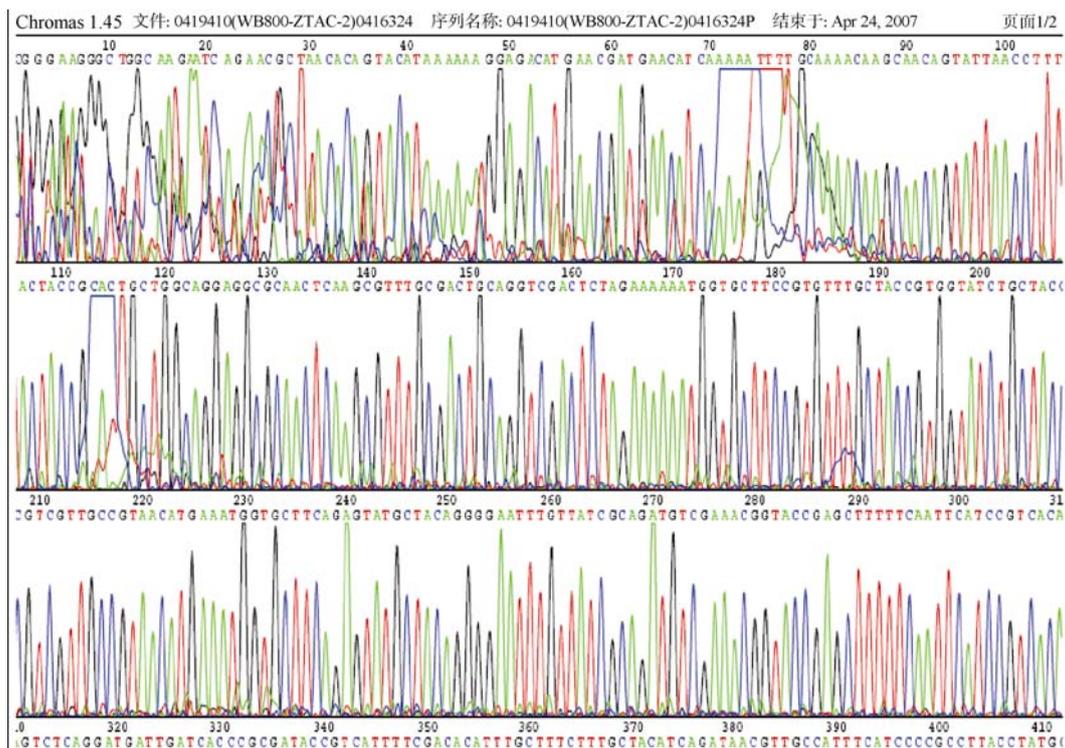


图 6 重组表达质粒 pSBPTQ-2TAC 测序图谱

Fig. 6 DNA sequence of pSBPTQ-2TAC

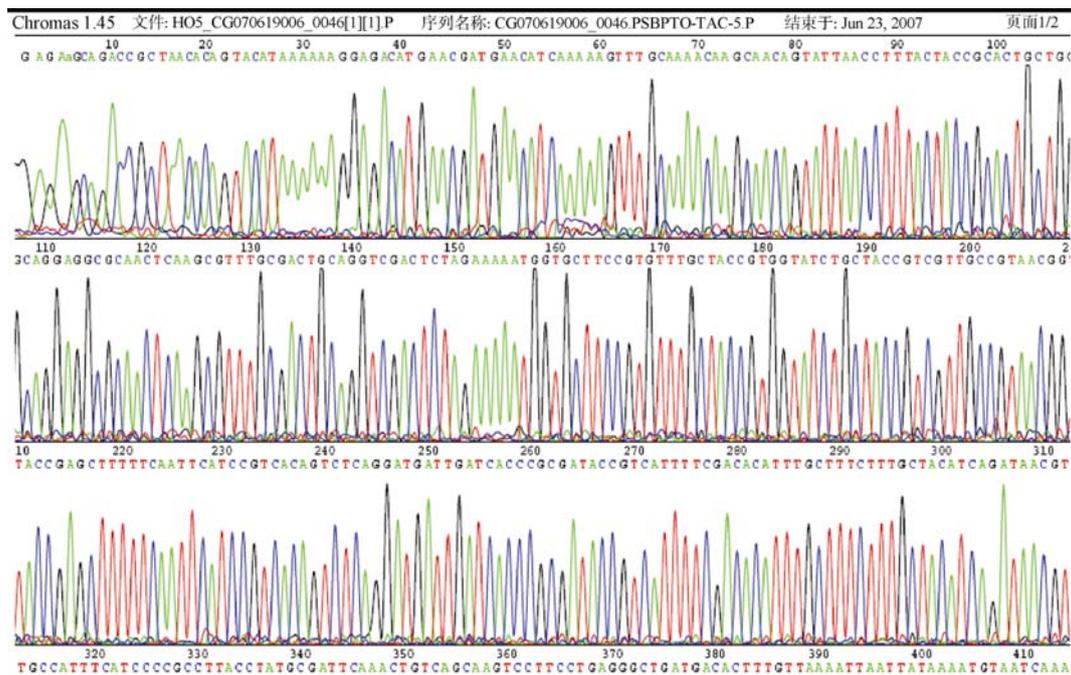


图 7 重组表达质粒 pSBPTQ-TAC 测序图谱

Fig. 7 DNA sequence of pSBPTQ-TAC

55%饱和度的硫酸铵进行盐析可得到大量的目的蛋白。因此，在分离纯化过程中，先用 55%饱和度的硫酸铵沉淀目的蛋白，进行浓缩处理。

发酵液经 55%饱和度的硫酸铵盐析沉淀后，在

蒸馏水中透析。透析液经 CM-Sepharose Fast Flow 柱层析，结果图 12(A,B)中显示出现 4 个蛋白峰，对各个峰进行抗菌活性分析后，第 IV 峰具有抗菌活性，如图 12(A,B)中箭头所指。目的产物所在的第 IV 峰在

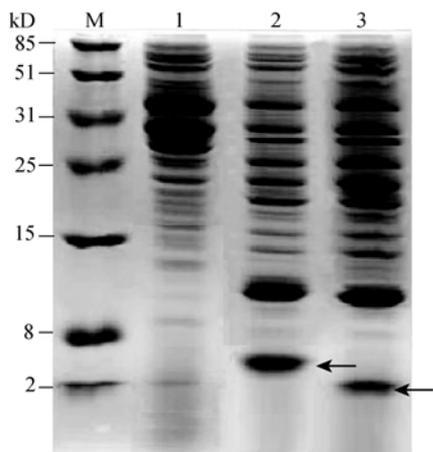


图 8 表达产物 2TAC 和 TAC 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of recombinant protein  
M. 标准 DNA 分子标记; 1. 对照 BS168//pSBPTQ; 2. 工程菌 BS168//pSBPTQ-2TAC; 3. 工程菌 BS168//pSBPTQ-2TAC  
M. Standard protein marker; 1. BS168//pSBPTQ; 2. BS168//pSBPTQ-2TAC; 3. BS168//pSBPTQ-2TAC

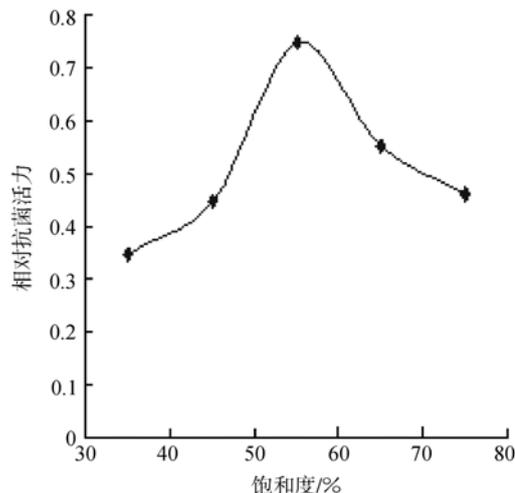


图 10 发酵液在不同硫酸铵饱和度盐析下的相对活性  
Fig. 10 The relative activity of fermentation in different concentrations of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

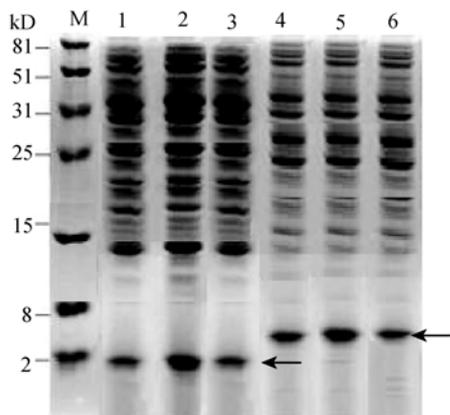


图 9 不同诱导时间下表达产物 2TAC 和 TAC 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 9 SDS-PAGE of 2TAC and TAC at different induced times  
M. 标准 DNA 分子标记; 1~3. 诱导 12, 24, 36 h 的工程菌 BS168//pSBPTQ-TAC; 4~6. 诱导 12, 24, 36 h 的工程菌 BS168//pSBPTQ-2TAC;  
M. Standard protein marker; 1~3. BS168//pSBPTQ-TAC induced after 12, 24, 36 h; 4~6. BS168//pSBPTQ-2TAC induced after 12, 24, 36 h

低浓度 0.1~0.2 mol/L 左右的 NaCl 被洗脱下来, 冷冻干燥, 用无菌水配得 tachyplesin 表达产物溶液 10 mL。离子交换柱收集的表达产物, 经高效液相色谱分析浓缩的表达产物 TAC 和 2TAC 的浓度分别为 5.46 mg/L 和 10.36 mg/L。纯化后经过 SDS-PAGE 分析结果见图 11, 由电泳结果可见, 重组的 2TAC 和 TAC 表达产物经分离纯化后, 获得均一的蛋白条带, 分子质量大小和上述鉴定相符。表明重组的 2TAC 和 TAC 表达产物获得成功。

## 2.7 对发酵上清液进行了活性鉴定, 抑菌活性鉴定

通过对表达产物 TAC 和 2TAC 以及 2TAC 的水解产物的抑菌圈观察, 诱导表达的目的蛋白溶液对 *E. coli* K88 和 *S. aureus* 的抑菌试验结果见(图 13)。从图 13 可以看出, tachyplesin 串联表达产物 2TAC 的抑菌圈明显小于单拷贝表达产物 TAC 的抑菌圈, 而 2TAC 经 BrCN 水解后的抑菌圈又明显大于单拷贝表达产物 TAC 的抑菌圈, 这表明 tachyplesin 串联体 2TAC 经水解后对大肠杆菌 K88 和 *S. aureus* 都具有明显的抑菌活性。

同时表达产物 TAC 和供试菌大肠杆菌 K88, 金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)共同孵育后, 从透射电镜观察(图 14)发现, 对照组(图 14-A,C)细胞结构完整, 细

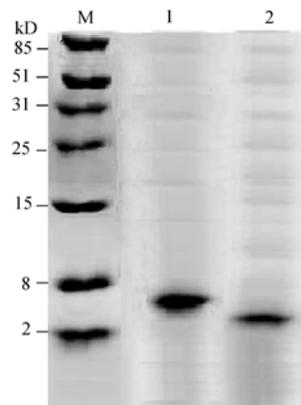


图 11 纯化后 2TAC 和 TAC 的 SDS-PAGE 分析  
Fig. 11 SDS-PAGE analysis of purified TAC and 2TAC  
M. 低分子量蛋白质标准品; 1. TAC; 2. TAC  
M. Standard protein marker; 1. TAC; 2. TAC

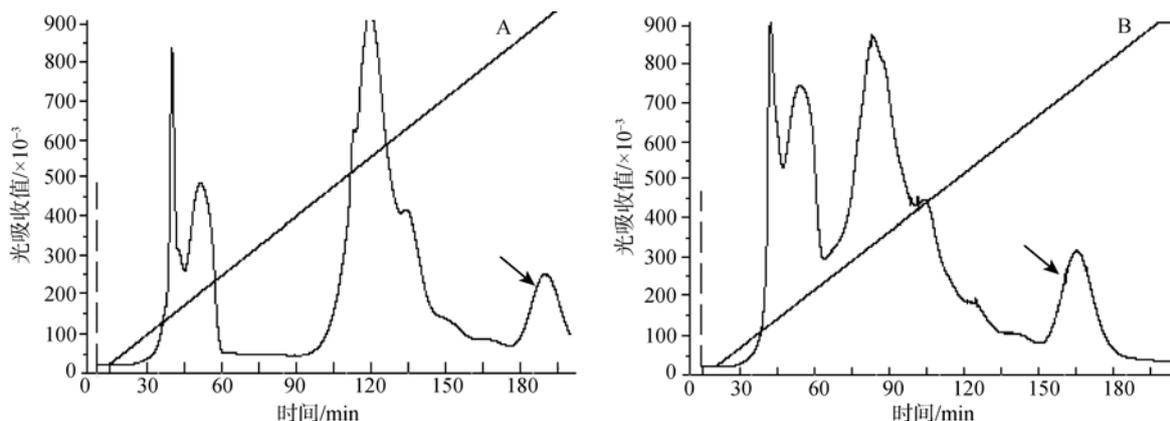


图 12 CM-Sepharose Fast Flow 阳离子交换层析图

Fig.12 2TAC and TAC purified by CM-Sepharose

A.TAC 纯化色谱图; B.串联 2TAC 纯化色谱图

A.TAC purified by CM-Sepharose Fast Flow; B.2TAC purified by CM-Sepharose Fast Flow

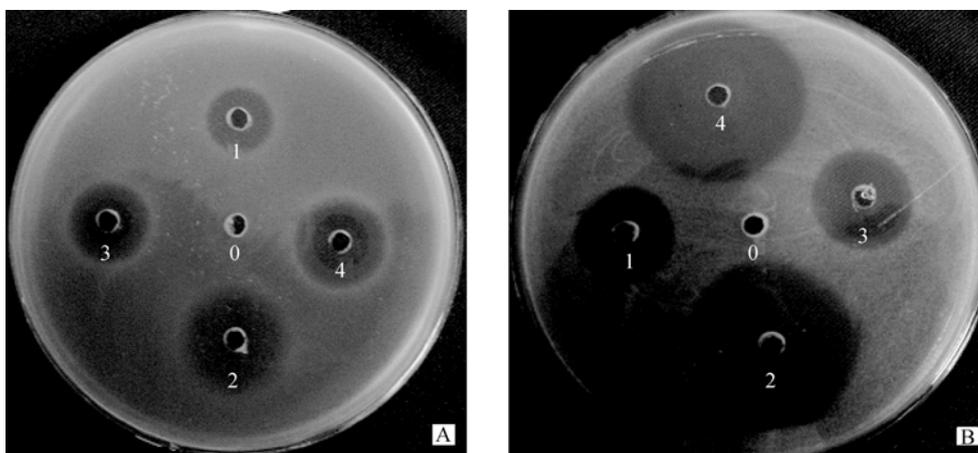


图 13 TAC 和 2TAC 及水解后 2TAC 对 *E.coli* K88 和 *S.aureus* 的抑菌圈

Fig. 13 Inhibition effects of 2TAC, TAC and 2TAC fragmented by BrCN against *E.coli* K88 and *S.aureus*

A. 金黄色葡萄球菌; B. 大肠杆菌 K88

A. *S.aureus*; B. *E.coli* K88

0. 对照上清; 1. 2TAC(5mg/L); 2. TAC(5mg/L); 3. 未水解的 2TAC(10mg/L); 4. 水解后的 2TAC(10mg/L)

0. WB800/pSBPTQ supernatant; 1. 5mg/L 的 2TAC; 2. 5mg/L TAC; 3. 10mg/L 的 2TAC(untreated); 4. 10mg/L 的 2TAC(BrCN treated)

胞外观平滑, 细胞壁膜完整, 细胞饱满, 细胞内容物充实、致密; 处理组(图 14-B,D)可以看出几点变化, 部分细胞膜出现裂解, 基本细胞形态保持, 细胞外观粗糙, 部分细胞壁膜裂解, 处理后金黄色葡萄球菌有两处明显的细胞膜出孔道现象, 细胞质结构松弛, 出现少许绒毛; 处理后大肠杆菌 K88 细胞质内空, 部分细胞器和细胞核区消失。上述透射电镜观察表明表达产物 TAC 具有抗菌活性。

### 3 讨论

本实验通过前期对 tachyplesin 抗菌谱的研究<sup>[10]</sup>, 发现抗菌肽 tachyplesin 对枯草杆菌的抑制作用, 明显低于对大肠杆菌的抑制作用, 因此我们

尝试利用枯草杆菌进行 tachyplesin 的表达。本实验首次完成了 tachyplesin 在枯草杆菌表达系统的高效表达, 在此之前进行的抗菌肽 tachyplesin 或类似抗菌肽的基因表达研究中, 只有通过大肠杆菌和酵母表达系统表达成功的, 但表达产量都很低。如张春义<sup>[14]</sup>用大肠杆菌表达成功, 对黄曲霉孢子具有活性; 张钊等<sup>[15]</sup>成功表达出抗菌肽 polyphemusin, 并具有抗菌活性。

本实验首次用枯草杆菌表达系统进行 tachyplesin 串联表达, 利用大肠杆菌-枯草杆菌穿梭表达载体 pSBPTQ 实现了串联基因 *2tac* 和单拷贝基因 *tac* 在枯草杆菌 BS168 中高效的表达。从表达产物的生物活性可以看出, 串联表达产物 2TAC 具

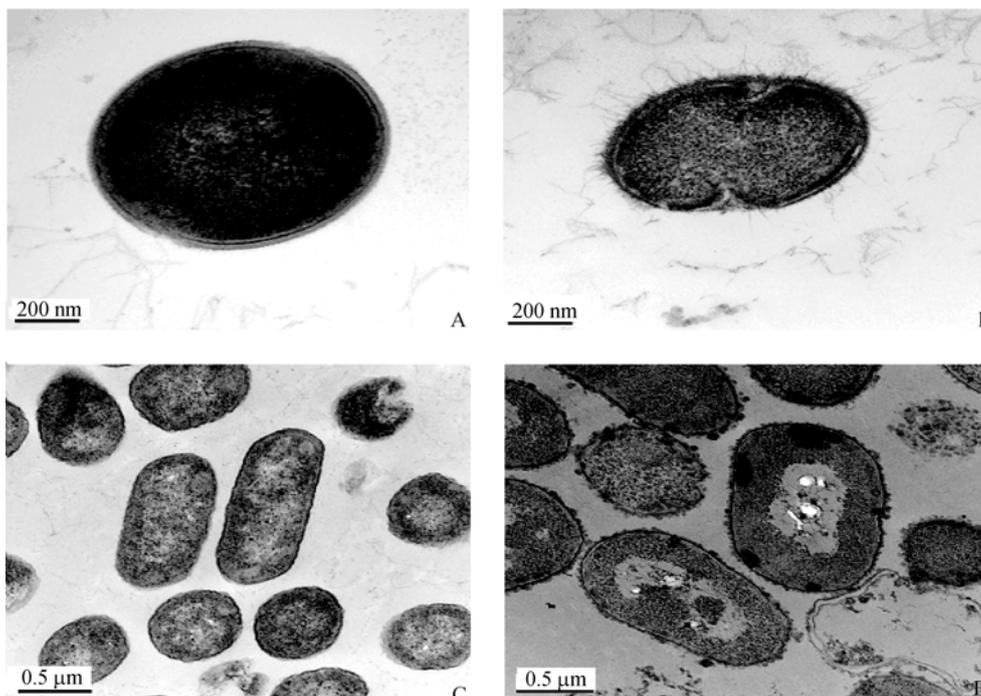


图 14 产物 TAC 处理的透射电镜图及未处理对照

Fig.14 Transmission electron microscopy of *S.aureus* and *E.coli* K88 after treated by TAC

A.金黄色葡萄球菌对照; B. 金黄色葡萄球菌处理; C. 大肠杆菌 K88 对照; D.大肠杆菌 K88 处理

A. *S.aureus* untreated; B. *S.aureus* treated; C. *E coli* K88 untreated; D. *E coli* K88 treated

有抗菌活性,但其抗菌活性低于单拷贝表达产物 TAC,当串联表达产物 2TAC 用 BrCN 水解后,水解液的抗菌活性明显增加,其最小抑菌浓度和单拷贝表达产物 TAC 相近。同时串联表达蛋白在连接处通过溴化氢水解后,可使表达产量增倍,这种方法有利于提高 tachyplesin 表达产量,同时降低表达产物对宿主细胞的毒性,实现 tachyplesin 的高效表达。这一研究结果为 tachyplesin 高效表达提供了重要研究方法,具有非常重要应用价值。

本实验采用枯草杆菌表达系统和串联基因表达方式,克服了表达产物对宿主的抑制作用,大大提高了产量,取得一定成功,但仍有许多地方需要改进:(1)本实验采用的宿主菌 BS168 是枯草杆菌表达系统中的最为广泛应用宿主菌,有许多优点,并在本实验中表达成功,但宿主菌 BS168 仍然存在一定问题,在 BS168 中已发现碱性蛋白酶、中性蛋白酶、金属蛋白酶、中性蛋白酶 B 和三种丝氨酸蛋白酶等多胞外蛋白酶,当外源蛋白分泌表达后,容易被这些蛋白酶降解,从而大大降低产率。枯草杆菌的这种特性,可能部分水解抗菌肽,造成表量低,在枯草杆菌 168 宿主菌基础上通过蛋白酶基敲除等手段,已经发展到多种蛋白酶缺陷型的宿主菌,如 8 种蛋

白酶的缺陷型 WB800 是剔除 8 种蛋白水解酶的工程菌,因此可选择更理想的表达系统<sup>[16]</sup>。另外可以在本文基础上选择一些真菌表达系统,如酵母表达系统,霉菌表达系统或植物表达系统;(2)鉴于本实验 2 拷贝的串联基因可以实现正确的表达,因此可以通过设计新的串联基因方法,实现多拷贝的串联基因进行表达,以进一步降低表达产物对宿主抑制,同时水解后成倍提高抗菌肽产量;(3)根据抗菌肽 tachyplesin 氨基酸序列特点,寻求更合理且无毒害的酶切位点;设计更为合理的,用无毒的,成本低的酶水解代替 BrCN 水解。

参考文献:

- [1] Nakamuro T, Furunaka H, Miyata T, et al. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*) [J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(32): 16 709-16 713.
- [2] Morvan A, Iwanaga S, Comps M, et al. In vitro activity of the limulus antimicrobial peptide tachyplesin I on marine bivalve pathogens [J]. *J Invertebr Pathol*, 1997, 69(2): 177-182.
- [3] 谢海伟,代建国,郭勇. 鲎源抗菌肽的研究及其潜在应用价值[J]. *生物技术通讯*, 2007, 18(3): 530-533.

- [4] 李瑞芳, 张添元, 罗进贤. 双功能枯草杆菌诱导型高效表达分泌载体的构建与鉴定[J]. 微生物学报, 2006, 46 (5): 714-719.
- [5] Dubnau D, Davidoff A R. Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. I. Formation and properties of the donor-recipient complex[J]. *J Mol Biol*, 1971, 56: 209-221.
- [6] Ye R, Kim J H, Kim B G, et al. High-level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *B.subtilis*[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 62(1): 87-96.
- [7] 郑伟, 韩文瑜, 韩俊友, 等. 中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)基因工程抗菌肽的制备及其抗菌活性[J]. 中国兽医学报, 2007, 27(2): 211-214.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [9] Harwood C R, Cutting S M. *Molecular biological methods for Bacillus* [M]. England: John Wiley & Sons, 1990.
- [10] Ye R Q, Kim J H, Kim B G, et al . High-level secretor production of intact, biologically active staphylokinase from *B.subtilis* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 62(1): 87-96.
- [11] 谢海伟, 代建国, 郭勇, 等. 鲎素抗菌肽的分子结构稳定性及生物活性华[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2008, 36(4): 144-150.
- [12] Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, et al. In vitro susceptibility tests for cationic peptides: comparison of broth microdilution methods for bacteria that grow aerobically[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44 (6): 1 694-1 696.
- [13] 代建国, 谢海伟, 金刚, 等. 鲎素的抗菌靶点初探[J]. 生物化学与生物物理进展. 2008, 35(5): 563-569.
- [14] 张春义, 范云六. 抗真菌鲎素基因在大肠杆菌中的表达[J]. 农业生物技术学报, 1998, 6(3): 211-216.
- [15] 张钊, 郑伟, 韩文瑜. 鲎抗菌肽 polyphemusin 基因的改造、克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 新疆农业学报, 2005, 42: 31-34.
- [16] Wu S C, Yeung J C, Wong S L. Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production [J]. *Appl Environ. Microbiol*, 2002, 68: 3261-3269.

## High expression of antimicrobial peptide tachyplesin I in *Bacillus subtilis* (BS168)

XIE Hai-wei, WEN Bing, WANG Di, QIAN Shi-quan, YANG Xian-song, XU Hui  
(Bengbu College; Food and Bioengineering department, Bengbu 233030, China)

Received: Apr., 20, 2010

**Key words:** tachyplesin ; construction of expression vector; expression of tandem-arranged gene; antimicrobial activity

**Abstract:** To produce tachyplesin , an antimicrobial peptide, by a stable and efficient gene engineering approach, cDNAs containing single tachyplesin gene sequence (*tac*) and tandem repeat of tachyplesin gene sequence (*2tac*) were, respectively, developed by annealing two synthesized complementary single-stranded DNAs and constructed into pSBPTQ shuttle vector. The vectors containing the target gene sequence were then transformed into *Bacillus subtilis* BS168. The secreted TAC and 2TAC were about 5.46 and 10.36 mg/L in the supernatant, respectively. Purified supernatant at different induced times was analyzed with SDS-PAGE. Then 2TAC was fragmented by BrCN. The antimicrobial activities of TAC, 2TAC and fragmented 2TAC were measured by the size of bacteriostatic circle of the fermentation supernatants against *Escherichia coli* K88. Ultrastructural alterations of *E.coli* K88 and *S.aureus* were observed under transmission electron microscopy. The results showed that in comparison with TAC, 2TAC was expressed at a higher level and also indicating strong antimicrobial activity in vitro. The amount of expression product of 2TAC was higher than TAC. BrCN-fragmented 2TAC showed higher activity than TAC.

(本文编辑: 康亦兼)