

蜜蜂抗菌肽 Abaecin 在枯草杆菌中的分泌表达

李 丽^{1,2}, 谯仕彦^{2*}, 祝发明², 敖长金¹

(1. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018; 2. 中国农业大学 国家饲料工程技术中心, 北京 100193)

摘要: 为了在枯草芽孢杆菌中分泌表达具有生物活性的 Abaecin, 采用重叠延伸 PCR 方法拼接合成含有编码 Abaecin 的基因及其相关调控元件的重组表达质粒 pGplat。将构建的表达质粒 pGplat 电击转化至枯草杆菌, 筛选正常生长的菌体, 摇瓶发酵, 取上清液冻干作为样品。通过 Western blot 试验检测 Abaecin 在枯草芽孢杆菌中的分泌表达情况。采用琼脂扩散法检测表达产物 Abaecin 的抑菌活性。Western blot 试验结果证实 3.9 ku 处有表达产物的目的条带。琼脂扩散法结果证明表达产物 Abaecin 对大肠杆菌、鸡沙门氏菌等革兰氏阴性菌有抑制活性。试验表明在枯草杆菌中能有效分泌表达具有生物活性的抗菌肽 Abaecin。本研究结果为开发全新高效抗生素肽类药物和饲料添加剂提供了理论依据。

关键词: 抗菌肽; Abaecin; 分泌表达; 重叠延伸 PCR; 枯草杆菌

中图分类号: S852.4; Q78

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)11-1681-05

Secretory-expression of Antimicrobial Peptide Abaecin from Bee in *Bacillus subtilis*

LI Li^{1,2}, QIAO Shi-yan^{2*}, ZHU Fa-ming², AO Chang-jin¹

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2. National Feed Engineering Technology Research Center, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: A recombinant plasmid pGplat containing the coding gene of abaecin was constructed, and it was transformed into *B. subtilis* 1A751 to express antimicrobial peptide abaecin. The overlap-extension PCR method was used to splice the recombinant plasmid pGplat. The constructed recombinant plasmid with multi-copy expression cassette was transformed into *Bacillus subtilis* strain by electroporation, positive clones were screened and inoculated to LB medium for expression under induction of maltose. The sample of culture supernatant of *B. subtilis* 1A751 was treated by vacuum freeze-drying. Western blot assays were applied to investigate the expression of the abaecin gene in *B. subtilis* 1A751. Bioactivity of abaecin in culture supernatant of *B. subtilis* 1A751 was tested with plate diffusion method. The results showed that the secretory-expressed abaecin was identified by Western blot, and there is a strap at 3.9 kD. Bioactivity of abaecin was tested with plate diffusion method, and it had high bacteriostatic activity against Gram-negative bacteria as *E. coli* and *Salmonella pullorum*. These results indicated that bioactive abaecin could be expressed in *B. subtilis* 1A751, which lays a foundation for further study of new efficient peptide antibiotics and feed additives.

Key words: antimicrobial peptide; abaecin; secretory-expression; overlap-extension pcr; *Bacillus subtilis*

收稿日期: 2009-05-25

作者简介: 李 丽(1979-), 女, 蒙古族, 内蒙古通辽人, 博士, 主要从事分子营养及分子免疫学研究, E-mail: lili523523@163.com

* 通讯作者: 谯仕彦(1963-), E-mail: qiaoshiy@mafic.ac.cn

近年来,抗生素在养殖业中被广泛应用,但是长期使用抗生素会导致抗生素在畜产品中残留,畜产品风味变差及细菌耐药性的产生,严重威胁人类健康。抗菌肽具有抗病毒和增强免疫作用,并且对机体无毒无害无残留,于是抗菌肽便成为抗生素的替代品。但是,天然抗菌肽很难得到,由于化学合成抗菌肽成本太高,因此,基因工程的方法成为人类瞩目的方法^[1]。Abaecin 是蜜蜂受到微生物或其他外源物质的侵染时产生体内的抗菌肽。含有 34 个氨基酸残基,其中包括 10 个脯氨酸残基,氨基末端序列与 Apidaecin 相似,但比 Apidaecin 有更广谱的抗革兰氏阴性菌的作用^[2]。Abaecin 的前体由 19 个氨基酸组成的信号肽和 34 个氨基酸组成的成熟肽组成,没有 Pro-sequence 序列,因此它的加工成熟过程非常简单,只需将信号肽除去即可,意味着它在分泌完成后就是一个成熟的分子^[3]。Abaecin 抗菌肽对革兰氏阴性菌有高杀伤力,对革兰氏阳性菌没有杀伤作用,所以,选用枯草芽孢杆菌 1A751 作为表达宿主菌。信号肽没有严格的专一性,因而可以利用宿主细胞自身的信号序列构建分泌载体,分泌外源蛋白。根据张美华^[4]、焦瑞清^[5]等的试验结果,前肽可以提高分泌量,有助于分泌表达,所以作者选用编码枯草杆菌素的前肽和信号肽与编码 Abaecin 的基因连接。枯草芽孢杆菌是一种传统的酶制剂生产菌株,其细胞壁结构简单,不分泌内毒素,可直接将表达产物分泌到培养基中,对人畜安全,是美国食品药品监督管理局(FDA)和中国农业部批准使用的安全

的菌株,是分泌表达外源基因的良好受体菌^[6]。而且,芽孢杆菌的分子遗传背景清楚,生长迅速,培养条件简单^[7]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 大肠杆菌 DH₅ α 感受态细胞购自天根生物技术有限责任公司;鸡白痢沙门氏菌由国家兽医微生物菌种保藏中心保存;枯草杆菌 1A751 来源于 The Bacillus Genetic Stock Center (BGSC);质粒 pHCMC05、质粒 pAX01、穿梭表达载体 pGJ103 由作者实验室保存。

1.1.2 主要试剂 各种限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq 酶、RT-PCR 试剂盒等均购自 Promega 公司。DNA Marker、DNA 回收试剂盒、RNA 回收试剂盒均购自 TIANGEN 公司。蛋白 Marker 购自纽英伦生物技术有限公司。抗菌肽单抗委托南京金思特公司制备。LB 培养基为 OXOID 产品。所用化学试剂均为 sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计 用引物设计软件 Primer Premier 5.0,根据枯草杆菌 168 基因组序列中 1105268-1105568 序列(GenBank 登录号:AL009126.3)设计扩增枯草杆菌素信号肽及前肽序列;根据 Abaecin 序列(GenBank 登录号:LOC406144),设计扩增 Abaecin 编码基因的 PCR 引物,见表 1。

表 1 用于扩增 AP 序列和重组质粒 pGplat 的引物

Table 1 Primers for amplifying DNA sequence of AP and recombinant plasmid pGplat

引物名称 Primers name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
F7	GAATTCGTGAGAAGCAAAAAATTGTGGATCAGCTTGTGTTTTCGCTTAACGTTAATCT
F6	CAGCTTGTGTTTTCGCTTAACGTTAATCTTTACGATGGCGTTCAGCAACATGTCTGCG
F5	TTACGATGGCGTTCAGCAACATGTCTGCGCAGGCTGCCGAAAAAGCAGTACAGAAAA
F4	CAGGCTGCCGAAAAAGCAGTACAGAAAAGAAATACATTGTTCGGATTTAAACAGACAA
F3	GAAATACATTGTTCGGATTTAAACAGACAATGAGTGCCATGAGTTCGCCAAGAAAAAG
F2	TGAGTGCCATGAGTTCGCCAAGAAAAAGGATGTTATTTCTGAAAAAGGCGGAAAGGT
F1	GATGTTATTTCTGAAAAAGGCGGAAAGGTTCAAAAGCAATTTAAGTATGTTAACGCGG
R1	TACAGCTTTTTTCATCCAATGTTGCTGCGGCCGCGTTAACATACTTAAATTGCTTTTTGA
R2	GCAACGCTCGGATCTTTTTTCAATTTCTTTTACAGCTTTTTTCATCCAATGTTGCTGCGG
R3	CATGTGCAATATGATCTTCTTCCACATATGCAACGCTCGGATCTTTTTTCAATTT
R4	CGGAACATTAGGTAACGGAACATAATATTCATGTGCAATATGATCTTCTTCCACATAT
R5	AATGTGCGAAACGGTCTTCTGCCCCGTTGCGGAACATTAGGTAACGGAACATAATATT
R6	TTTTCGGATTAACGGTCTTCTGCCCCGAAATGTGCGAAACGGTCTTCTGCCCCGTTG
R7	CCGCGGTTAATAGCCTTGCGCCATTTAATTTTCGGATTAACGGTCTTCTGCCCCGGA

1.2.2 AP 的人工合成 重叠 PCR 法合成含有编码抗菌肽 Abaecin 的 DNA 序列 AP。此序列通过 7 组 PCR 合成。第 1 组的引物对是 F_1 、 R_1 ，第 2 组的引物对是 F_2 、 R_2 ，第 3 组的引物对是 F_3 、 R_3 ，第 4 组的引物对是 F_4 、 R_4 ，第 5 组的引物对是 F_5 、 R_5 ，第 6 组的引物对是 F_6 、 R_6 ，第 7 组的引物对是 F_7 、 R_7 。第 1 组 PCR 扩增反应体系:引物对 F_1 、 R_1 各取 $2 \mu\text{L}$ ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)，分别加上 $5 \mu\text{L}$ dNTP Mixture ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $5 \mu\text{L}$ $10 \times$ Buffer、 $0.3 \mu\text{L}$ *Pfu* DNA 聚合酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 和 $35.7 \mu\text{L}$ ddH₂O。反应条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 3 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 30 s, 降温到 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 5 min。将扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶鉴定, 并记为 P_1 。第 1 组 PCR 扩增反应体系, 以 P_1 为模板, F_2 、 R_2 为上下游引物对, 然后进行常规 PCR, 将扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶鉴定, 并记为 P_2 。第 3 组 PCR 扩增以 P_2 为模板, F_3 、 R_3 为上下游引物对, 然后进行常规 PCR, 将扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶鉴定, 并记为 P_3 , 依此类推。进行第 7 组 PCR 反应后, 将所得扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶鉴定, 并用 DNA 片段试剂盒回收正确的 AP 片段。

1.2.3 穿梭表达质粒 pGplat 的构建 通过 PCR 将质粒 pHCMC05 的启动子 Pspac 及阻遏蛋白基因 LacI 构建入穿梭载体 pGJ103 的 *Apa* I 与 *Eco* R I 位点之间, 获得载体 pGpl; 在表达载体 pGpl 的 *Eco* R I 和 *Sac* II 酶切位点间构建入 AP, 获得表达载体 pGpla; 在 pGpla 的 *Sac* II 和 *Sac* I 酶切位点亚克隆质粒 pAX01 的终止子 t_0t_1 , 得到最终所需的表达质粒 pGplat (图 1)。

1.2.4 诱导表达 重组质粒 pGplat 通过电转化至枯草芽孢杆菌 1A751 中, 涂布于含有终浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氯霉素的固体 LB 培养基上, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜培养。筛选阳性转化子, 在液体 LB 培养基中, $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 12 h。然后按 1:1 000 扩大于发酵培养基中, 摇瓶发酵, 发酵 8 h 时加麦芽糖诱导表达。

1.2.5 Tricine-SDS-PAGE 发酵 36 h 时, 离心收集发酵上清液 ($10\ 000 \text{ g}$, 15 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), 真空冷冻干燥样品。于浓度为 12% 的分离胶中进行 Tricine-SDS-PAGE。

1.2.6 Western blot 将目的条带电转移至硝酸纤维膜上, 以 Abaecin 单抗为一抗 (1:100 稀释), 羊抗兔 IgG-HRP (1:1 000 稀释) 为二抗, 用

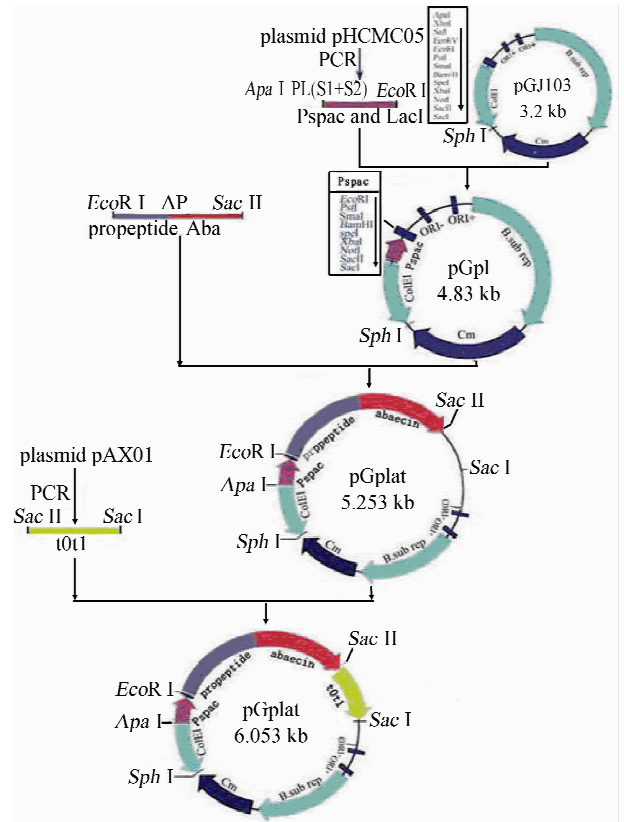


图 1 pGplat 的构建过程

Fig. 1 Construction process of pGplat

ECL 化学发光系统检测 Abaecin 的分泌表达^[8]。

2 结果

2.1 重组质粒 pGplat 的鉴定

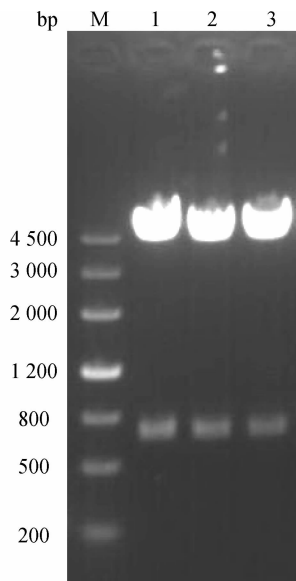
通过酶切、连接、转化、提取质粒等步骤, 得到重组质粒 pGplat。用限制性内切酶 *Apa* I 和 *Sac* II 酶切鉴定重组质粒 pGplat 和 DNA 测序鉴定, 结果都与预期相吻合 (图 2)。说明重组质粒 pGplat 构建成功。

2.2 Abaecine 抑菌活性的鉴定

发酵 36 h 时, 取发酵上清液做抑菌圈。利用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和鸡白痢沙门氏菌 (*Salmonella pullorum*) 检测, 均有较强的抑菌效果 (图 3)。证明分泌表达的 Abaecin 有广谱抗阴性菌的抑菌效果。

2.3 Tricine-SDS-PAGE 和 Western blot 分析

取冻干的样品, 做 Tricine-SDS-PAGE 和 Western blot 检测。阳性转化子样品在 3.9 ku 处有条带, 而携空载体的对照样品未出现条带 (图 4)。证明 Abaecin 基因克隆成功并高效分泌表达。



M. DNA Marker III; 1~3. 经 *Apa* I 和 *Sac* II 酶双切的重组质粒 pGplat

M. DNA Marker III; 1-3. Recombinant plasmid pGplat by *Apa* I and *Sac* II digested

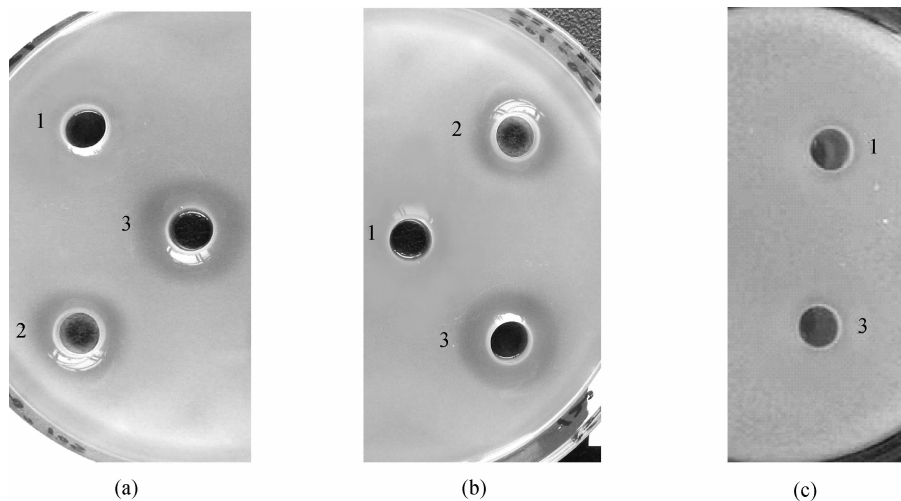
图 2 重组质粒 pGplat 双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pGplat by enzymes digestion

3 讨论

抗菌肽 Abaecin 对革兰氏阴性菌有强杀伤力, 很多致病菌都是革兰氏阴性菌, 例如, 很常见的鸡白痢沙门氏菌、鸡伤寒沙门氏菌和引发仔猪白痢的大肠杆菌等, 所以抗菌肽 Abaecin 在畜牧养殖业中有很大的潜在利用价值。因为天然抗菌肽相对分子质量小, 在机体内含量很少, 分离提纯困难, 天然产量非常有限, 所以, 通过廉价的方法得到大量的抗菌肽 Abaecin 具有很大的研究意义, 利用基因工程技术生产抗菌肽便成为人们关注的焦点^[9]。

利用基因工程技术生产抗菌肽首先面临的问题是选择合适的宿主菌。枯草芽孢杆菌是很有潜力的分泌型基因工程宿主菌。长期以来被用于酶、抗生素和精细化工产品的发酵工业生产。在表达外源基因方面有着无可比拟的独特优势: (1) 对外源基因的分泌能力强, 能保持外源蛋白生物学活性, 也较为容易纯化; (2) 枯草芽孢杆菌培养条件简单, 发酵和产物回收工艺成熟; (3) 对人畜无害, 不产生内毒素; (4) 与酵母等真菌比较, 发酵周期短, 碳源利用率高,



1. 1A751 的培养基上清液 400 μ L; 2. 1A751-pGplat 的培养基上清液 200 μ L; 3. 1A751-pGplat 的培养基上清液 400 μ L
1. 400 μ L culture supernatant of 1A751 ; 2. 200 μ L culture supernatant of 1A751-pGplat; 3. 400 μ L culture supernatant of 1A751-pGplat

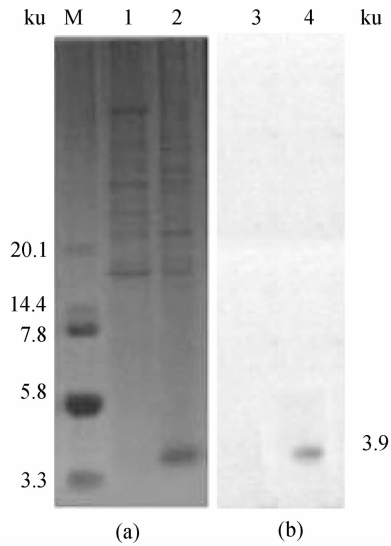
图 3 培养液上清中抗菌肽 Abaecin 对大肠杆菌 (a)、鸡白痢沙门氏菌 (b) 和枯草杆菌 (c) 的抑菌活性

Fig. 3 Inhibition effects of abaecin in culture supernatant on *Escherichia coli*, *Salmonella pullorum* and *Bacillus subtilis*

分泌大蛋白的能力更强^[4]。本试验的创新点就是结合抗菌肽 Abaecin 对革兰氏阴性菌有很强的杀伤力, 而对革兰氏阳性菌没有杀伤力这一特点, 选择革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌作为表达宿主菌。利用枯

草杆菌具有良好的分泌性和非致病性, 具有分泌表达外源蛋白的天然优势, 通过基因工程方法, 使抗菌肽 Abaecin 在枯草芽孢杆菌中直接表达并分泌到细胞外。利用枯草芽孢杆菌的分泌表达优势的同时又

避免了表达产物对宿主菌的自身杀灭,解决了抗菌肽 Abaecin 原核表达的难题。



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 空载体发酵液上清(1A751); 2. 重组体发酵液上清(1A751-pGplat); 3. 阴性对照(1A751); 4. 表达产物(1A751-pGplat)

M. Molecular weight marker; 1. The concentrated culture supernatant of negative control (1A751); 2. The concentrated culture supernatant of recombinant plasmid (1A751-pGplat); 3. Negative control (1A751); 4. Expression product (1A751-pGplat)

图 4 Tricine-SDS-PAGE (a) 和 Western blot (b) 分析表达产物

Fig. 4 Tricine SDS PAGE (a) and Western blot (b) analysis of expression products

本试验采用分泌型表达载体是独立质粒,不需要将外源基因整合到宿主菌基因组中,能将外源蛋白跨膜转运到培养基中,不需要细胞破碎或裂解,降低了纯化难度,可简化生产工序,降低生产成本。为今后开发全新高效抗生素肽类药物和饲料添加剂提供了理论基础。

参考文献:

- [1] PESCHEL A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides [J]. *Trends Microbiol*, 2002, 10(4): 179-186.
- [2] CASTEELS P, AMPE C, RIVIERE L, et al. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*) [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1990, 187(2): 381-386.
- [3] EVANS J D, PETTIS J S. Colony-level impacts of immune responsiveness in honey bees, *Apis mellifera* [J]. *Apis Mellifera Evolution*, 2005, 59(10): 2270-2274.
- [4] 张美华, 周建, 杨宇峰, 等. 血小板生成素在枯草杆菌中的表达分泌及前肽作用[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 生物化学与分子生物学专辑, 2005, 1: 19-23.
- [5] 焦瑞清, 吴自荣, 戚蓓静, 等. 枯草杆菌新型克隆、表达载体 pNC3 特性及在蛋白质分泌机制研究中的应用[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 1997, 生物化学与分子生物学专辑: 21-25.
- [6] DOI R H, WONG S L, KAWAMURA F. Potential use of *Bacillus subtilis* for secretion and production of foreign proteins [J]. *Trends Biotechnol*, 1986, 4(9): 232-235.
- [7] 彭清忠, 张惟材, 朱厚咄. 枯草杆菌表达系统的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2001, 12: 220-225.
- [8] 李朴, 文阳安, 刘靳波, 等. 抗菌肽 Bactenecin7 重组质粒构建及其在乳酸菌的分泌表达和活性鉴定[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(1): 70-74.
- [9] 韩宗玺, 马得莹, 刘胜旺, 等. 重组鸡抗菌肽 Gallinacin-9 的原核表达及其抗菌活性的鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(10): 1426-1431.