蜂毒肽在大肠杆菌中的高效融合表达与纯化

周丽仙[1,2]，张荣珍*[1,2]，李利宏[1,2]，徐 岩[1,2]
（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 工业微生物教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：生物法制备蜂毒肽是实现大量制备蜂毒肽的关键技术。为实现蜂毒肽的高效表达，通过化学法合成含信号肽、前导肽和成熟肽的蜂毒肽基因 *promet* 和蜂毒肽成熟肽基因 *met*，与麦芽糖结合蛋白基因 *mbp* 连接，克隆到载体 pET15-b，构建重组质粒 pET-MBP-MET 和 pET-MBP-proMET。重组质粒转化大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)，以 0.1 mmol/L IPTG 进行诱导，30 ℃下过夜诱导，融合蛋白 MBP-MET、MBP-proMET 在大肠杆菌中以可溶性形式高效表达。两种目标蛋白质经 Ni 柱和 Dextrin Sepharose HP 两步亲和纯化，得到了纯度达 90%以上的融合蛋白 MBP-MET、MBP-proMET，培养 1 L 大肠杆菌菌液能制备约 20 mg 纯蛋白质。通过牛津杯抑菌实验发现，MBP-MET、MBP-proMET 能明显抑制细菌生长，产生明显的抑菌圈，MBP-MET 和 MBP-proMET 最低抑菌浓度(MIC)分别为 100 μg/mL 和 140 μg/mL。本研究首次实现了蜂毒肽的高效表达，并进行了抑菌功能验证，为生物法制备蜂毒肽提供了高效、安全的合成途径。

关键词：蜂毒肽；大肠杆菌；麦芽糖结合蛋白；高效表达；纯化；抑菌
中图分类号：Q 786　**文章编号**：1673-1689(2020)08-0026-08　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.08.004

High-Efficiency Fusion Expression of Melittin in *Escherichia coli* and Its Purification

ZHOU Lixian[1,2]，*ZHANG Rongzhen*[*1,2]，*LI Lihong*[1,2]，*XU Yan*[1,2]
(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China ; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The preparation of melittin by biological method is a key technology for the large-scale preparation of melittin. To achieve efficient expression of melittin, the melittin gene *met* coding mature peptide and its *promet* containing the signal peptide, leader peptide and mature peptide were chemically synthesized. The two genes were linked with the maltose binding protein gene *mbp* and cloned into the vector pET15-b to construct the recombinant plasmid pET-MBP-MET and pET-MBP-proMET. The recombinant plasmids were then transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) and induced with 0.1 mmol/L IPTG. The fusion protein MBP-MET and MBP-proMET were efficiently expressed in *E. coli* in soluble form treated overnight at 30 ℃. The two soluble target proteins were purified by two steps of Ni-affinity and Dextrin Sepharose HP affinity. The fusion

收稿日期：2018-11-12
基金项目：国家自然科学基金项目(31670070)；江苏省“六大人才”高峰高层次人才项目(2015-SWYY-010)；国家轻工技术与工程双一流学科自主课题(LITE2018-12)；高校人才引进项目(111-2-06)；江苏高校品牌专业建设工程项目。
* **通信作者**：张荣珍(1973—)，女，博士，教授，博士研究生导师，主要从事生物催化和酶工程方面的研究。E-mail：rzzhang@jiangnan.edu.cn

proteins MBP-MET and MBP-proMET were obtained with an over 90% purity. About 20 mg of pure protein was prepared by 1 L of recombinant *E. coli* culture. The inhibition experiments of bacteria by MBP-MET and MBP-proMET were carried out. The obvious inhibition zone was observed in the Oxford Cup antibacterial experiments. The minimum inhibitory concentrations of MBP-MET and MBP-proMET were about 100 μg/mL and 140 μg/mL, respectively. Highly efficient expression was successfully achieved in this research. The function verification of melittin was confirmed, providing an efficient and safe synthetic route for the biological preparation of melittin.

Keywords: melittin, *Escherichia coli*, maltose binding protein, high expression, purification, antibacterial

蜂毒肽来自于欧洲蜜蜂(*Apis mellifra*),是蜜蜂毒液中的主要毒性成分,是一种重要的阳离子生物活性肽,具有很好的抗菌[1-3]、抗炎症[4-7]、抗肿瘤[8-11]和抗艾滋[12]等生物功能。

蜂毒肽由26个氨基酸残基组成(NH_2-GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-$CONH_2$),其中疏水性主要集中在氨基末端区域(残基1~20),而亲水性主要集中在含有一段带正电荷的氨基酸残基的羧基末端区域(残基21~26)[13]。蜂毒肽因具有两亲性质而具有水溶性,容易结合在带负电荷的膜表面[14],对膜具有强扰动活性,通过形成跨膜孔或离子通道或以表面活性剂的活性方式作用,伴随着原子、离子和分子的泄漏以及膜渗透性的增强来干扰磷脂双分子层的完整性[15-17]。在蜜蜂的生物合成过程中,首先形成含信号肽和前导肽的前体蛋白——前蜂毒肽(proMET),经过剪切前导肽和信号肽后释放形成蜂毒肽(MET)[18]。由于蜂毒肽前体蛋白富含酸性氨基酸和脯氨酸,且前结构域带有高度负电荷而赋予分子整体负电荷,因而比蜂毒肽具有更大的溶解度,也因此降低了对细胞膜的破坏能力[10]。

制备蜂毒肽主要有3种途径:从天然蜜蜂毒液中直接分离纯化[19]、化学合成法以及生物法制备。目前,蜂毒肽的获得方式主要是从蜂毒中分离提纯,或者通过化学合成的方式来获得。由于蜂毒肽只占蜂毒干质量的50%,从蜂毒中分离大量蜂毒肽存在极大的局限性。且分离纯化蜂毒肽首先要获得蜂毒,生产中常用电刺激蜜蜂采取蜂毒,往往以蜜蜂生命为代价,不利于蜜蜂群势发展和养蜂生产。并且由于蜂毒成分复杂,存在多种蛋白质,且各组分相对分子质量接近,尤其是与蜂毒肽相对分子质量接近的磷脂酶A2,造成了纯化上的困难、操作的繁琐以及高成本,使蜂毒肽的广泛应用受到了限制。化学合成法主要是以氨基酸为原料,通过固相合成法等方法合成多肽或蛋白质,具有污染严重且目标蛋白质得率低等缺点。

生物法制备蜂毒肽,由于蜂毒肽相对分子质量只有2 900且不容易活性表达,同时在蜂毒肽的纯化过程中也存在困难。因为蜂毒肽表现出对细胞高效的致死性,并且容易被细菌体内的蛋白酶降解,因而直接在原核系统中难以表达。因此充分开发利用生物法制备蜂毒肽,具有很好的社会经济效益和应用前景。

作者选用麦芽糖结合蛋白基因与蜂毒肽基因进行融合表达,获得高效可溶性表达的蜂毒肽融合蛋白。融合表达具有多方面的优点:实现外源基因的高效转译,有助于减少或防止包涵体的产生,促进蛋白质的正确折叠,限制蛋白酶降解和有助于纯化等。麦芽糖结合蛋白(maletose-binding protein,MBP)是大肠杆菌中麦芽糖积累途径里一个重要的蛋白质,有研究报道MBP具有强助溶作用,可以显著提高与之融合的外源蛋白质的可溶性表达[20]。将麦芽糖结合蛋白质基因分别克隆在前蜂毒肽基因、蜂毒肽基因N端,并插入6个组氨酸标签,构建在质粒pET15-b上,在大肠杆菌中能够高效可溶性表达目标蛋白质。经两步亲和纯化,得到了纯度高达90%以上的融合蛋白质,通过牛津杯抑菌实验确定了融合蛋白质的抑菌功能。该制备方法为生物法制备蜂毒肽奠定了较好的研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 质粒pET15b、MBP3、大肠杆菌(*E. coli*)JM109和BL21(DE3)菌株:江南大学酿造微生物学与应用酶学研究室保存;*promet*基因:由

生工生物工程(上海)股份有限公司(Sangon)合成;质粒 pMD19-T:购自宝生物工程(大连)有限公司(Takara);引物合成和测序:由金唯智生物科技有限公司(苏州)完成。

1.1.2 主要试剂 氨苄青霉素、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 IPTG:购自 Sangon 公司;PrimeStar® Max (Premix)、*r*Taq DNA polymerase for PCR、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶、DNA marker、蛋白质相对分子质量 marker:购自 Takara 公司;PCR 产物纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒:购自 Omega 公司。

1.1.3 主要仪器 Ni 柱(5 mL)、Dextrin Sepharose HP 亲和吸附柱(1 mL),ÅKTA purifier 蛋白质纯化系统:购自美国 GE Healthcare 公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物的设计与合成 根据 Dmitry S. Perekalin 等[21]报道的蜂毒肽氨基酸序列(含信号肽和前导肽)进行密码子优化化学合成 *promet* 基因,并设计引物,序列见表 1。上游引物 PF1、PF2,引入 His6 基因,下游引物 PR2 引入 *Xho* I 酶切位点(用下划线表示)。以质粒 MBP3 为模板设计引物,上游引物 PF3,5'引入 *Nco* I 酶切位点,下游引物 PR2。

1.2.2 *met*、*promet* 基因与 *mbp* 基因的扩增 以化学合成的 *promet* 基因为模板,由引物对 PF1/PR1、PF2/PR1 经 PCR1 分别扩增 MET 片段和 proMET 片段。PCR 条件设为:98 ℃预变性 30 s,以 98 ℃变性 15 s,55 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 20 s,进行 30 个循环,72 ℃保温 10 min;以质粒 MBP3 为模板,由引物 PF3、PR2 进行 PCR2 扩增 MBP 片段。PCR 条件设为:98 ℃预变性 30 s,以 98 ℃变性 15 s,55 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 1 min 10 s,进行 30 个循环,72 ℃保温 10 min;以 MET 片段和 MBP 片段为模板,由引物对 PF3/PR2 重叠延伸扩增 MBP-MET 片段,以 proMET 片段和 MBP 片段为模板,由引物对 PF3/PR2 重叠延伸扩增 MBP-proMET 片段。PCR 条件设为:98 ℃预变性 30 s,以 98 ℃变性 15 s,55 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 1 min 20 s,进行 10 个循环。加入引物 PF3 和 PR2 再进行 20 个循环,72 ℃保温10 min。PCR 产物用 1 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物纯化后用 T4 DNA 连接酶与载体 pMD19-T 于 16 ℃连接 4 h,连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,100 μg/mL 氨苄青霉素(Amp)抗性 LB 平板筛选阳性克隆,提取的质粒经琼脂糖凝胶电泳及测序鉴定,质粒分别命名为 pMD19T-MBP-MET 和 pMD19T-MBP-proMET。

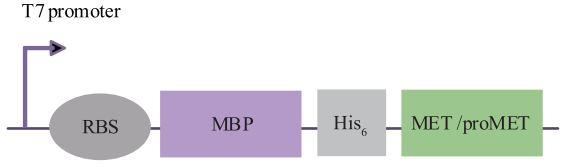
表 1 引物

Table 1 Primers

引物	序列(5'→3')
PF1	CATCACCATCATCATCACGGCGGAGGCTCAATGGGTATCGGTGCTGTTCTGAAAGTTCTGACC
PF2	CATCACCATCATCATCACGGCGGAGGCTCAATGAAATTCCTGGTTAACGTTGCTCTGG
PR1	CCGCTCGAGTTAACCCTGCTGACGTTTACGTTTGATC (*Xho* I)
PF3	CATGCCATGGCATCCAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGG (*Nco* I)
PR2	GTGATGATGATGGTGATGCCCGGCACCGTCGCCGTTAATTAAAGTCTGC

下划线表示限制酶切割位点。

1.2.3 重组表达载体 pET-MBP-MET 和 pET-MBP-proMET 构建 限制性内切酶 *Xho* I 和 *Nco* I 分别双酶切重组克隆质粒 pMD19T-MBP-MET 和 pMD19T-MBP-proMET,琼脂糖凝胶回收插入片段 MBP-MET 和 MBP-proMET,分别与用相同限制酶双酶切的表达载体 pET15-b 过夜连接,连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,涂布 100 μg/mL Amp 抗性 LB 平板,挑取单菌落抽提质粒进行测序,序列正确的质粒分别命名为 pET-MBP-MET 和 pET-MBP-proMET,构建示意图见图 1。



MBP-His_6 分别融合在 MET 和 proMET 的 N 末端,表达由起始密码子前面的核糖体结合位点(RBS)和 T7 启动子控制。

图 1 标签融合的 pET-MBP-MET、pET-MBP-proMET 质粒构建示意图

Fig. 1 Schematic representations of the tag-fused pET-MBP-MET, pET-MBP-proMET constructs

1.2.4 融合蛋白质的诱导表达 分别转化重组表达质粒 pET-MBP-MET、pET-MBP-proMET 至 *E. coli* BL21(DE3)感受态,涂布于含有 100 μg/mL Amp 的 LB 的固体培养基上,37 ℃培养过夜,挑取单菌落接种于含有 100 μg/mL Amp 的 LB 的液体培养基中,37 ℃、200 r/min 振荡培养 10 h 后,按体积分数 1%的转接至 100 mL 新鲜的含有 100 μg/mL Amp 的 LB 的液体培养基中,37 ℃、200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 约为 0.6 时,添加终浓度为 0.1 mmol/L 的诱导物异丙基-D-硫代半乳糖苷(IPTG),于30 ℃、200 r/min 诱导培养 16 h。4 ℃下离心收集菌体细胞,超声破碎后收集离心的上清液及沉淀,加入 4× SDS-PAGE loading buffer 煮沸 10 min,用 9%SDS-PAGE 进行验证。

1.2.5 融合蛋白质 MBP-MET 和 MBP-proMET 的纯化 重组大肠杆菌 *E. coli* BL21/pET-MBP-MET、*E. coli* BL21/pET-MBP-proMET 分别在上述条件诱导培养后,将 500 mL 发酵菌液离心收集菌体,加入 50 mL Ni 柱平衡缓冲液 A1 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl),4 ℃高压匀浆破碎后,12 000 r/min 离心 30 min 收集上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,缓慢上样于 Ni 柱亲和吸附柱,缓冲液 B1 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl,500 mmol/L 咪唑)线性洗脱,紫外检测仪在线检测洗脱峰,收集洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳检测。

将初步纯化后的样品超滤浓缩,并更换缓冲液 A2 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl),上样于 Dextrin Sepharose HP 亲和吸附柱上,用缓冲液 A2 洗脱杂蛋白质,缓冲液 B2(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl,10 mmol/L 麦芽糖)洗脱目标蛋白质。收集洗脱液,用 9% SDS-PAGE 电泳检测纯化效果。

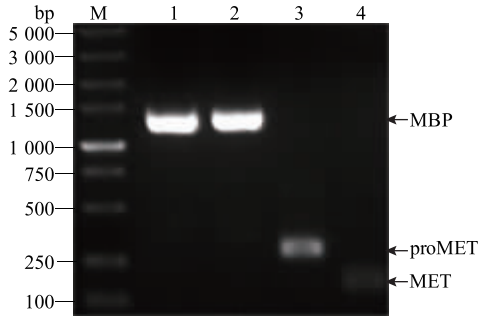
1.2.6 牛津杯法抑菌活性测定 准备 *E. coli* BL21/pET-MBP-MET 细胞破碎上清液、纯化后 MBP-MET、MBP-proMET 融合蛋白液。从 *E. coli* JM109 无抗平板上挑取单菌落至 5 mL LB 液体培养基,37 ℃培养 4 h,转接 500 μL 种子液至 50 mL LB 培养基中,37 ℃培养 2 h 至 OD_{600}=0.5。预先倾倒 20 mL LB 培养基至玻璃平板铺平凝固。吸取 1 mL 菌液至 200 mL 保温于 50 ℃的琼脂培养基中混匀,快速吸取 5 mL 至平板铺平待凝。待上层培养基凝固后,将灭菌后的牛津杯(8 mm × 6 mm × 10 mm)垂直立于平板标志附近。牛津杯中分别加入过滤除菌的 100 μL *E. coli* BL21/pET-MBP-MET 细胞破碎上清液和纯化后 MBP-MET、MBP-proMET 融合蛋白液(0.25 mg/mL),100 μL Amp(0.1 mg/mL)做阳性对照。盖上平皿盖,将平皿置于 37 ℃恒温培养箱培养 16~18 h。观察抑菌圈情况。

1.2.7 最小抑菌浓度(MIC)测定 采用微量稀释法测定 MBP-MET、MBP-proMET 融合蛋白质的最低抑菌浓度。对数生长期的 *E. coli* JM109 菌液按 1∶10^5 稀释至 10^6 cfu/mL,取 100 μL 菌悬液加入 U 型微量板。过滤除菌后的 MBP-MET、MBP-proMET 稀释至终质量浓度分别为 160、140、120、100、80、60、40、20、10、5 μg/mL,聚苯乙烯 U 型微量板每孔加入100 μL 稀释后蛋白质液。对照组加入 100 μL 无菌水,37 ℃振荡培养 18~20 h 后观察结果。

2 结果与分析

2.1 *met*、*promet* 基因与 *mbp* 基因的扩增

蜂毒肽 *met*、前蜂毒肽 *promet* 与麦芽糖结合蛋白 *mbp* 基因经 PCR 扩增后分别获得 126、252、1 152 bp 的特异性片段,见图 2。重叠延伸后得到 MBP-MET 和 MBP-proMET 片段。将 PCR 产物连接至克隆载体 pMD19-T,测序结果表明 MBP-MET 基因片段正确插入 pMD19-T 载体。



M: DNA marker;1, 2: MBP 的 PCR 产物; 3: proMET 的 PCR 产物; 4: MET 的 PCR 产物.

图 2 pET-MBP-MET 表达载体构建

Fig. 2 Construction of pET-MBP-MET expression vector

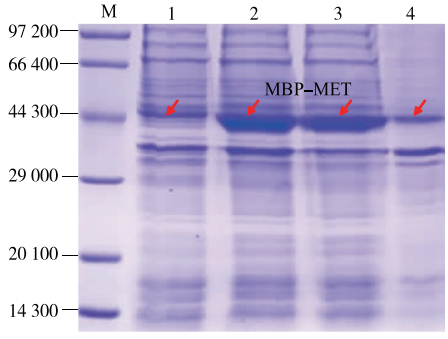
2.2 重组表达载体 pET-MBP-MET、pET-MBP-proMET 构建

对 pMD19T-MBP-MET、pET-MBP-proMET 和 pET15-b 分别使用限制性内切酶 *Xho* I 与 *Nco* I 进行双酶切处理,胶回收片段大小为 1 300 bp 的 MBP-MET 基因片段、1 400 bp 的 MBP-proMET 片

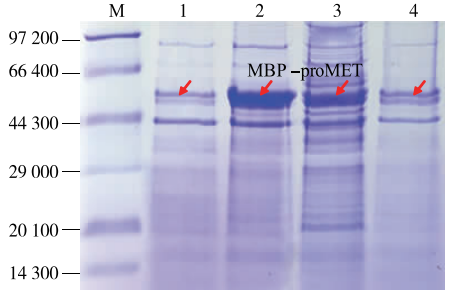
段和 5 600 bp 的 pET15-b 线性片段,使用 T4 DNA 连接酶过夜连接,连接产物转化 *E. coli* JM109,在氨苄抗性平板上挑取阳性克隆,提取的质粒进行测序鉴定,得到 6 917 bp 的 pET-MBP-MET 和 7 043 bp的 pET-MBP-proMET。

2.3 蜂毒肽融合蛋白质的诱导表达

将表达质粒 pET-MBP-MET 转入 *E. coli* BL21,挑取单菌落培养,在 0.1 mmol/L IPTG、30 ℃条件下诱导表达,收集细胞,每 100 mL 培养基能收集 0.6 g 湿菌。重悬并超声破碎后离心收集上清液,进行 SDS-PAGE 验证。结果如图 3 所示,上清液可见相对分子质量 46 200(见图 3(a))和 50 800(见图 3 (b)) 的条带,分别与融合蛋白质 MBP-MET 和 MBP-proMET 理论大小一致,且上清液中目标条带浓度高于沉淀。经凝胶电泳成像仪分析,上清液的目标条带占全细胞总量的 15%,说明融合蛋白质 MBP-MET 在重组大肠杆菌中主要以可溶性蛋白质的形式表达。



(a) *E. coli* BL21 / pET-MBP-MET的表达产物



(b) *E. coli* BL21 / pET-MBP-proMET的表达产物

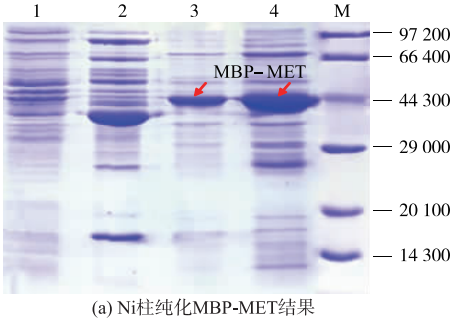
M: 蛋白质相对分子质量 Marker (Low); 1: 诱导前; 2: 诱导后; 3: 离心后澄清裂解液; 4: 离心后沉淀.

图 3 *E. coli* BL21/pET-MBP-MET、*E. coli* BL21/pET-MBP-proMET 表达产物 SDS-PAGE

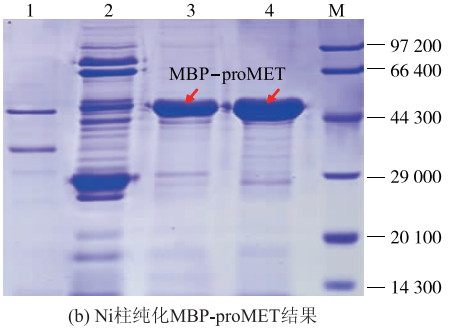
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression products of *E. coli* BL21/pET-MBP-MET and *E. coli* BL21/pET-MBP-proMET

2.4 融合蛋白质 MBP-MET 和 MBP-proMET 的纯化

将诱导表达后的重组菌 *E. coli* BL21/pET-MBP-MET 和 *E. coli* BL21/pET-MBP-proMET 分别离心收集菌体,加入缓冲液 A1 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl) 重悬后用高压匀浆机破碎,离心后的上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,使用 Ni 柱亲和吸附柱纯化,分别用含 30 mmol/L 咪唑和 100 mmol/L 咪唑的缓冲液 B1 洗脱,紫外检测到出现洗脱峰。收集洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果见图 4。30 mmol/L 咪唑洗脱大量杂蛋白质,100 mmol/L 咪唑洗脱时目标蛋白质几乎全部洗脱下来。但经过 Ni 柱亲和柱纯化后的目标蛋白质里含有杂质,需经过进一步纯化。因此将初步纯化后的样品超滤浓缩,并更换平衡缓冲 A2(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl),上样于 Dextrin Sepharose HP 亲和吸附柱上,用缓冲液 A2 洗脱杂蛋白质,以 10 mmol/L 麦芽糖的缓冲液 B2 洗脱目标蛋白质,SDS-PAGE 结果见图 5。经凝胶电泳成像仪分析 SDS-PAGE 结果,最终得到纯度高达 90%的蛋白质样品。通过计算,每升菌液可以纯化得到 20 mg 左右的纯蛋白质。



(a) Ni柱纯化MBP-MET结果

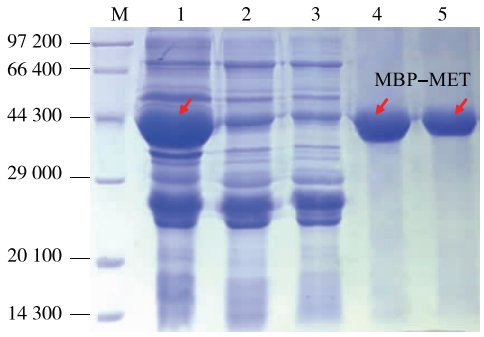


(b) Ni柱纯化MBP-proMET结果

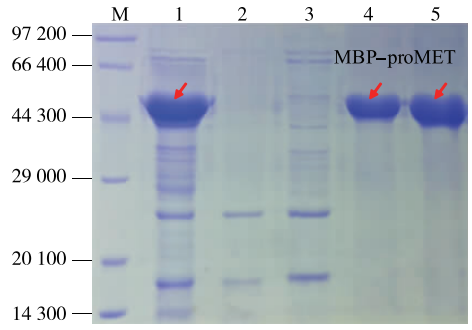
M: 蛋白质相对分子质量 Marker (Low); 1: 平衡缓冲 A1 洗涤; 2: 30 mmol/L 咪唑洗脱; 3, 4: 100 mmol/L 咪唑洗脱.

图 4 融合蛋白质 MBP-MET、MBP-proMET 的 Ni 柱纯化

Fig. 4 Purification of fusion protein MBP-MET and MBP-proMET with Ni column



(a) Dextrin Sepharose HP纯化MBP-MET结果



(b) Dextrin Sepharose HP纯化MBP-proMET结果

M: 蛋白质相对分子质量 Marker (Low); 1: Ni 柱纯化后浓缩液; 2, 3: 平衡缓冲 A2 洗涤; 4, 5: 10 mmol/L 麦芽糖洗脱.

图 5 融合蛋白质 MBP–MET、MBP–proMET 的 Dextrin Sepharose HP 纯化

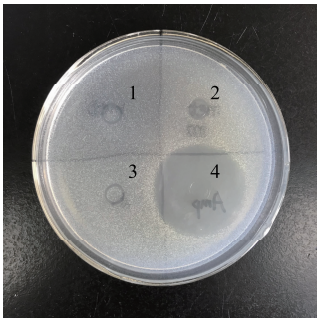
Fig. 5 Purification of fusion protein MBP –MET and MBP–proMET with Dextrin Sepharose HP

2.5 牛津杯法测定 MBP–MET 和 MBP–proMET 的活性

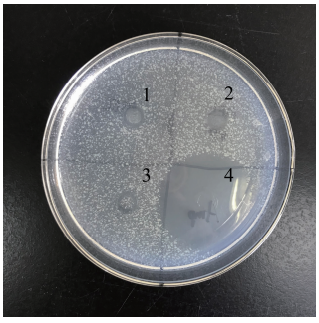
通过牛津杯实验鉴定融合蛋白质 MBP–MET 和 MBP–proMET 的抑菌活性。从图 6 可知,与阴性对照相比,纯化后的 MBP–MET 和 MBP–proMET 均对大肠杆菌有明显的抑制效果。经测量 MBP–MET 的抑菌圈直径为 9.2 mm(见图 6(a)),MBP–proMET 的抑菌圈直径为 8.8 mm(见图 6(b))。MBP–MET 的抑菌效果比 MBP–proMET 好。可能由于融合蛋白质的相对分子质量比较大且结构较抗生素复杂,并且实现其生物活性还需要其特定的空间结构,而琼脂平板的网状结构不利于融合蛋白质快速的扩散到周围,使得其抑菌圈相对抗生素的较小。

2.6 MBP–MET 和 MBP–proMET 的最低抑菌浓度

微量稀释法判断不同质量浓度 MBP–MET 和 MBP–proMET 的纯化后蛋白质对 *E. coli* JM109 的抑菌效果,对照组有细菌生长,将肉眼观察到没有细菌生长的培养孔中的药物质量浓度定为 MIC,判断生长抑制标准为肉眼观察未发现培养液混浊或沉淀现象出现。从表 2 可知,MBP–MET 对 *E. coli* JM109 的 MIC 为 100 μg/mL,MBP–proMET 对 *E. coli* JM109 的 MIC 为 140 μg/mL。



(a) MBP-MET的抑菌结果



(b) MBP-proMET的抑菌结果

1: 细胞破碎后上清液; 2: 纯化后融合蛋白质; 3: ddH_2O; 4: Amp.

图 6 融合蛋白质 MBP–MET、MBP–proMET 对 *E. coli* JM109 的抑菌效果

Fig. 6 Antibacterial activity of fusion protein MBP–MET and MBP–proMET on *E. coli* JM109

表 2 微量稀释法测定 MBP–MET、MBP–proMET 对大肠杆菌的 MIC

Table 2 Determination of the MIC of MBP –MET and MBP–proMET against *E. coli* by microdilution method

融合蛋白质质量浓度/(μg/mL)	MBP–MET	MBP–proMET
160	–	–
140	–	–
120	–	+
100	–	+
80	+	+
60	+	+
40	+	+
20	+	+
10	+	+
0	+	+

“+”表示肉眼可见细菌生长,“–”表示细菌生长抑制.

3 结 语

蜂毒肽作为一种具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、溶血等多种生理活性的活性肽,已受到广泛关注。但由于蜂毒肽对细胞具有一定的致死性,蜂毒肽在原核生物和真核生物中难以表达。

人们曾通过重组蜂毒肽与其它功能性基因融合表达。文良柱等[22]将蜂毒肽5~12位氨基酸与死亡素4~21位氨基酸基因克隆在载体pET32-a上,在*E.coli* BL21(DE3)中融合表达成杂合肽MT,但目标肽的产率没有明确。张宏刚等[23]将蜂毒肽(3~14)与贻贝素B(13~27)杂合,在巴斯德毕赤酵母(*Pichia pasioris*)中通过甲醇诱导表达获得Mel-MytB杂合肽,直接进行表达产物的抑菌分析,结果得到表达产物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鸡沙门氏菌等具有抑菌活性,但该实验并未对表达产物进行纯化得到单纯杂合肽,且诱导时间长达24~72 h,培养时间较长。杨光勇[24]通过SOE-PCR技术连接抗白细胞介素4受体(IL-4R)单链抗体scFv与蜂毒肽(MLT)基因,构建抗IL-4R单链抗体连接蜂毒肽的重组质粒pET-32a-scFv-MLT,转入*E.coli* BL21(DE3)内诱导表达,scFv-MLT融合蛋白质主要以包涵体形式表达。

在重组蜂毒肽的文献报道中,标签蛋白质谷胱甘肽转移酶(GST)在与蜂毒肽重组表达中应用最多,但GST在增加蜂毒肽的可溶性表达上存在一定局限。胡宗利等[25]将蜂毒肽(melittin)基因序列定向克隆到表达载体pESP-2中,构建GST-melittin融合蛋白质,在裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中进行异源表达,1 L培养液收集到约5 g鲜活酵母菌,纯化得到400 μg融合蛋白质,存在诱导时间较长,目标肽产率相对较低等局限。朱文赫等[26]将人工合成整合了肠激酶作用位点的蜂毒肽(MEL)基因,插入到载体pGEX-2T,构建融合表达载体pGEX-MEL,通过*E. coli* BL21(DE3)成功表达GST-MEL融合蛋白质,但可溶性表达产物较少,每毫克融合蛋白质经肠激酶切割后得到78.8 μg蜂毒肽。Buhrman和Jason S[27]构建了含有GST-6×His-melittin的质粒pJB-HTS-melittin并在*E. coli* Rosetta 2细胞里表达,并用不断增加浓度的轻度非离子去污剂从不溶部分重复萃取,富集了GST-6×His-melittin融合蛋白质,每升菌液能得到0.5~1 mg蜂毒肽融合蛋白。

作者采用融合表达的方案,首次应用麦芽糖结合蛋白质作为融合伴侣,通过增加溶解性增加了蜂毒肽的表达量,同时构建了含信号肽和前导肽的前蜂毒肽重组菌株,克服了蜂毒肽对细胞的毒性,实现了蜂毒肽的可溶性表达。通过Ni柱和Dextrin Sepharose HP两步亲和纯化,得到了高纯度的融合蛋白质MBP-MET和MBP-proMET。牛津杯抑菌实验鉴定了两种融合蛋白质的抑菌活性,且MBP-proMET对大肠杆菌的最低抑菌浓度高于MBP-MET,猜测可能是由于引入的前导肽和信号肽结构域中带有高度负电荷增加了分子整体所带负电荷,因而比蜂毒肽成熟肽单独表达具有更大的溶解度,因而降低了对细胞膜的损伤能力。最低抑菌浓度高于Tony Picoli等[28]报道的42.5 μg/mL,说明麦芽糖融合蛋白质在增加蜂毒肽的溶解性的同时,其大分子结构对抑菌效果有一定的影响。在试验探究过程中,曾设计采用TEV蛋白酶切割大分子融合标签,发现MBP标签蛋白质不完全影响蜂毒肽的功能,但对TEV酶的切割有较大影响,究其原因可能是标签蛋白质部分包裹了蛋白酶切位点。也尝试将蜂毒肽基因构建在pGEX-6p-1上进行原核表达,但目标蛋白质GST-MET主要以包涵体形式表达,说明不同的融合伴侣蛋白质对蜂毒肽的异源表达有较大的影响。蜂毒肽的蛋白质结构已经获得解析[13],整体结构为一个完整的α螺旋,在后续研究中,我们将尝试GST-MET包涵体变复性实验以及纯化,并采用圆二色谱对MET的二级结构进行复性监控,进一步为"纯净"蜂毒肽的制备奠定较坚实的研究基础。

参考文献:

[1] LEE J, LEE D G. Melittin triggers apoptosis in *Candida albicans* through the reactive oxygen species-mediated mitochondria/caspase-dependent pathway[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2014, 355(1): 36-42.

[2] SHI W, LI C Y, LI M, et al. Antimicrobial peptide melittin against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen in rice[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016, 100(11): 5059-5067.

[3] LEANDRO L F, MENDES C A, CASEMIRO L A, et al. Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A (2) of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens[J]. **An Acad Bras Cienc**, 2015, 87(1): 147-155.
[4] LEE W R, KIM K H, AN H J, et al. The protective effects of melittin on *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory responses in vitro and in vivo[J]. **Journal of Investigative Dermatology**, 2014, 134(7): 1922-1930.
[5] PARK H J, LEE S H, SON D J, et al. Antiarthritic effect of bee venom - Inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-kappa B through interaction with the p50 subunit[J]. **Arthritis and Rheumatism**, 2004, 50(11): 3504-3515.
[6] NAH S-S, HA E, MUN S H, et al. Effects of melittin on the production of matrix metalloproteinase-1 and -3 in rheumatoid arthritic fibroblast-like synoviocytes[J]. **Journal of Pharmacological Sciences**, 2008, 106(1): 162-166.
[7] PARK J H, KUM Y S, LEE T I, et al. Melittin attenuates liver injury in thioacetamide-treated mice through modulating inflammation and fibrogenesis[J]. **Experimental Biology and Medicine**, 2011, 236(11): 1306-1313.
[8] HAIT W N, GRAIS L, BENZ C, et al. Inhibition of growth of leukemic cells by inhibitors of calmodulin: phenothiazines and melittin[J]. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 1985, 14(3): 202-205.
[9] JUHANIEWICZ J, SEK S. Interaction of melittin with negatively charged lipid bilayers supported on gold electrodes[J]. **Electrochimica Acta**, 2016, 197: 336-343.
[10] SCHWEIZER F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity[J]. **European Journal of Pharmacology**, 2009, 625(1-3): 190-194.
[11] KOHNO M, HORIBE T, OHARA K, et al. The membrane-lytic peptides K8L9 and melittin enter cancer cells via receptor endocytosis following subcytotoxic exposure[J]. **Chemistry & Biology**, 2014, 21(11): 1522-1532.
[12] WANG B Z, LIU W, KANG S M, et al. Incorporation of high levels of chimeric human immunodeficiency virus envelope glycoproteins into virus-like particles[J]. **Journal of Virology**, 2007, 81(20): 10869-10878.
[13] SATO H, FEIX J B. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2006, 1758(9): 1245-1256.
[14] BERNHEIMER A W, RUDY B. Interactions between membranes and cytolytic peptides[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1986, 864(1): 123-141.
[15] JAMASBI E, CICCOTOSTO G D, TAILHADES J, et al. Site of fluorescent label modifies interaction of melittin with live cells and model membranes[J]. **Biochimica et Biophysica Acta–Biomembranes**, 2015, 1848(10): 2031-2039.
[16] KATSU T, KUROKO M, MORIKAWA T, et al. Mechanism of membrane damage induced by the amphipathic peptides gramicidin S and melittin[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1989, 983(2): 135-141.
[17] LEE S Y, PARK H S, LEE S J, et al. Melittin exerts multiple effects on the release of free fatty acids from L1210 cells: Lack of selective activation of phospholipase A(2) by melittin[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2001, 389(1): 57-67.
[18] HABERMANN E. Bee and wasp venoms[J]. **Science**, 1972, 177(4046): 314-322.
[19] LEE Y, KIM S G, KIM I S, et al. Standardization of the manufacturing process of bee venom pharmacopuncture containing melittin as the active ingredient[J]. **Evid–Based Complementary and Alternative Medicine**, 2018,(2018): 2353280.
[20] SORENSEN H P, MORTENSEN K K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Biotechnology**, 2005, 115(2): 113-128.
[21] PEREKALIN D S, NOVIKOV V V, PAVLOV A A, et al. Selective ruthenium labeling of the tryptophan residue in the bee venom peptide melittin[J]. **Chemistry**, 2015, 21(13): 4923-4925.
[22] 文良柱, 张家骊, 钱坤, 等. 蜂毒肽与死亡素杂合肽 MT 在大肠杆菌中融合表达的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(6): 45-48.
[23] 张宏刚, 吴剑良, 李莉. 杂合抗菌肽 Mel-MytB 在毕赤酵母中的表达及其抗菌活性测定[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(11): 3246-3252.
[24] 杨光勇, 刘茜明, 刘莉莉, 等. 抗 IL-4R 单链抗体与蜂毒肽融合蛋白的构建、表达与纯化[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2018, 47(2): 193-197.
[25] 胡宗利, 刘志昭, 邓磊, 等. 蜂毒肽融合蛋白在裂殖酵母中的表达研究[J]. 药物生物技术, 2010, (1): 33-38.
[26] 朱文赫, 田立玲, 孙妙囡, 等. 蜂毒肽基因在大肠杆菌中的表达、纯化及初步鉴定[J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(1): 1-5.
[27] BUHRMAN J S, RAYAHIN J E, COOK L C, et al. Active, soluble recombinant melittin purified by extracting insoluble lysate of *Escherichia coli* without denaturation[J]. **Biotechnology Progress**, 2013, 29(5): 1150-1157.
[28] PICOLI T, PETER C M, ZANI J L, et al. Melittin and its potential in the destruction and inhibition of the biofilm formation by *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine milk[J]. **Microbial Pathogenesis**, 2017, 112: 57-62.