DOI:10.12441/spyswjs.20230214001 [文章编号] 1673-1689(2024)07-0047-09

# 无融合标签的蜂毒肽在大肠杆菌中的表达纯化和抑菌研究

彭鑫怡[1,2] 席志文[1,2] 张荣珍[1,2*] 徐 岩[1,2]

(1. 江南大学工业微生物教育部重点实验室,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122)

**摘要:**蜂毒肽(Melittin,MET)是一种具有抗炎和抗肿瘤作用的小分子活性肽,其可溶性表达和无融合标签活性肽的纯化一直是个难题。基于类弹性蛋白(Elastin-like polypeptide, ELP)的相变特性和内含肽(Intein)的自裂解特性,构建重组表达菌株 *Escherichia coli*/pET21a-ELP-Intein-MET,在 *E. coli* BL21(DE3)宿主细胞中实现融合蛋白的可溶性表达。重组菌破碎上清液经过温度诱导的可逆相变循环纯化以及融合蛋白自裂解的pH、温度和时间优化,在pH 7.0、30 ℃的条件下自裂解32 h,再经过凝胶层析纯化,得到了纯度高于95%的无融合标签的蜂毒肽。纯化后的蜂毒肽用于 *Staphylococcus aureus*、*Bacillus subtilis* 168 和 *Escherichia coli* JM109 的抑菌研究,发现其对革兰氏阳性菌的抑制作用强于革兰氏阴性菌,蜂毒肽在3种菌中的最小抑菌质量浓度分别为12.5、50.0、100.0 μg/mL。作者通过引入弹性蛋白和内含肽,不仅实现了蜂毒肽的高效可溶性表达,且通过较简便的蛋白质分离纯化获得无融合标签的蜂毒肽,该纯化活性肽的抑菌功能与商品化的蜂毒肽相似,有望为蜂毒肽的工业化制备提供新的思路。

**关键词:**蜂毒肽;ELP 标签;内含肽;抑菌活性

# Expression, Purification and Bacteriostatic Study of Melittin Without Fusion Label in *Escherichia coli*

*PENG Xinyi*[1,2] *XI Zhiwen*[1,2] *ZHANG Rongzhen*[1,2*] *XU Yan*[1,2]

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Melittin is one kind of small molecule active peptide with anti-inflammatory and antitumor effects. The soluble expression and purification of melittin to obtain active peptide without fusion label has always been a problem. The authors conducted a recombinant expression strain *Escherichia coli*/pET21a-ELP-Intein-MET based on the phase transition property of elastin-like polypeptide (ELP) and the self-cracking property of intein. Soluble expression of fusion protein was achieved in *E. coli* BL21 (DE3) cells. The supernatant of the recombinant cells was purified by a temperature-induced reversible phase transformation cycle, and optimization of pH, temperature and time of the fusion protein self-lysis. The melittin without fusion label with a purity of over 95% was obtained after lysis at pH 7.0 and 30 ℃ for 32 h, and the following gel chromatography. The inhibition experiments of purified melittin against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* 168 and *Escherichia coli* JM109 were performed. Melittin showed a stronger inhibitory effect for gram-positive bacteria than gram-negative

**基金项目:**国家“十四五”重点研发计划项目(2023YFA0914500);国家自然科学基金项目(31970045);江苏省研究生科研与实践创新计划项目(1012050205205974);国家轻工技术与工程一流学科(LITE2018-12);高等学校学科创新引智计划项目(111-2-06)。

**通信作者:**张荣珍(1973—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事氧化还原酶催化手性化合物和食品酶生物制备研究。E-mail:rzzhang@jiangnan.edu.cn

**收稿日期:**2023-02-14 **改回日期:**2023-03-17

bacteria. The minimum inhibitory concentrations of melittin for 3 strains of bacteria were 12.5 μg/mL, 50 μg/mL and 100 μg/mL, respectively. The authors realized the high expression of melittin by the introduction of elastin and endopeptide, and non-fusion labelled melittin was purified by a simple isolation. The bacteriostatic functions of purified active melittin were very similar to that of commercial melittin, which is expected to provide new insights for the industrial preparation of melittin.

**Keywords:** Melittin; ELP tag; Intein; Antibacterial activity

蜂毒肽是一种两亲性六肽[1-2]，约占蜂毒干质量的一半，由疏水性氨基酸组成，赖氨酸和精氨酸残基的存在使其在生理pH下的净电荷为+6。在低质量浓度和低离子强度的水溶液中，蜂毒肽会显现出随机的螺旋构象；在去污剂分子或类脂膜存在的情况下，蜂毒肽呈现出α-螺旋结构；在低肽浓度下是单体；在高盐浓度和/或高酸碱度下，多为四聚体[3]。蜂毒肽能够诱导孔形成，使细胞裂解[4]，具有抗炎、镇痛的作用[5]，可以有效治疗类风湿关节炎，甚至对艾滋病病毒等具有杀伤作用[6]。最新报道表明，特定质量浓度的蜂毒肽可以完全杀死乳腺癌细胞，且对正常细胞的影响很小[7]。

目前获取蜂毒肽的途径有3种：化学合成、从粗蜂毒中分离纯化[8]和生物工程法[9-10]。化学合成可以获得具有生物活性的蜂毒肽纯品，但成本较高[11]。目前，蜂毒肽主要从粗蜂毒中分离纯化得到，但存在手段烦琐、产量低、成本高等问题。利用基因工程技术表达蜂毒肽基因时，由于蜂毒肽的高细胞毒性及对细胞膜的破坏性，研究人员主要采用蛋白质融合表达法克服蜂毒肽的内源毒性[11-12]。但融合蛋白纯化往往存在标签带来的氨基酸残留问题，无法获得与天然蜂毒肽氨基酸序列完全一致的小肽。

ELP由重复的氨基酸序列组成，即$(VPGXG)_n$，其中X不能是脯氨酸，该基序来源于弹性蛋白序列VPGVG[13]。重复序列小的ELP标签（5~40个五肽）可以提高重组蛋白产量，重复序列大的ELP标签（80~160个五肽）可以提高纯化期间靶蛋白的回收率，且不会对融合蛋白的生物活性产生影响[14]。在水溶液中，ELP在很窄的温度范围内发生可逆的反相相变，在低于逆转变温度Tt下，ELP是可溶的；如果超过该温度，则不可溶，且这一过程完全可逆[15]。Intein具有自我剪接功能，可从前体蛋白中切除并将两侧多肽连接在一起形成成熟的蛋白质[16]，剪接过程中不需要核酸内切酶参与[17]，在适当的温度和酸碱度变化或硫醇化合物的诱导下，这些元件可以有效地从其碳或氮末端释放靶蛋白[18-19]。

作者根据ELP和Intein的特性，设计了一种无需核酸内切酶就能分离目标蛋白质的表达系统，利用类弹性蛋白的温度诱导可逆相变特性可以选择性沉淀和分离目标蛋白质，在温和条件下通过Intein的自主剪切能力去除融合标签，获得高纯度的蜂毒肽，该纯化活性肽与商品化蜂毒肽抑菌生理活性相似。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 重组菌株和载体 *Escherichia coli* JM109和*E. coli* BL21（DE3）分别用于基因克隆和蛋白质表达，*Staphylococcus aureus*、*E. coli* JM109以及*Bacillus subtilis* 168用于抑菌试验，pET-21a（+）质粒用于构建表达载体，以上菌株与载体均保存于作者所在实验室。

1.1.2 主要试剂 质粒提取试剂盒：南京诺唯赞生物科技股份有限公司；氨苄青霉素、异丙基硫代半乳糖苷（IPTG）、感受态细胞制备试剂盒、低相对分子质量蛋白质Marker、2× Tricine上样缓冲液：生工生物工程（上海）股份有限公司；其余分析纯试剂：天津康克德科技有限公司。

1.1.3 培养基与缓冲液 LB培养基：蛋白胨10.0 g，酵母提取物5.0 g，NaCl 10.0 g，去离子水定容至1.0 L。PBS缓冲液：NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g、$Na_2HPO_4$ 1.44 g、$KH_2PO_4$ 0.24 g溶于800 mL去离子水中，用HCl水溶液调节pH至7.4，去离子水定容至1 L。Tris-SDS-PAGE电泳缓冲液：SDS 1.5 g，Tris 4.5 g，甘氨酸21.6 g，去离子水定容至1.5 L。

Tricine-SDS-PAGE 10×阳极缓冲液：121.1 g Tris，400 mL超纯水溶解，调节pH至8.9后用去离子水定容至500 mL。

Tricine-SDS-PAGE阴极缓冲液：Tris 12.11 g，

Tricine 17.92 g，SDS 1 g，去离子水定容至1 L。

### 1.2　表达载体的构建

蜂毒肽目的基因来自于欧洲蜜蜂（*Apismellifra*）的蜂毒肽（Gene ID: 406130），将其与类弹性蛋白ELP（X=V∶A∶G=5∶2∶3，*n*=30，*M*=11 800）基因和来自结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）的内含肽基因*recA*（*M*=18 600）连接获得融合蛋白ELP-Intein-MET的基因序列，见图1。随后对融合蛋白基因序列按照大肠杆菌的密码子偏好性进行优化，优化后的序列委托生工生物工程（上海）股份有限公司进行化学合成，并构建至载体pET-21a（+）上，获得重组质粒pET21a-ELP-Intein-MET。




图1　重组表达质粒ELP-Intein-MET示意图

Fig. 1　Schematic diagram of recombinant expression plasmid ELP-Intein-MET

### 1.3　融合蛋白的诱导表达与纯化

将重组质粒pET21a-ELP-Intein-MET转化至*E. coli* BL21（DE3）感受态细胞中，挑取阳性单克隆于含50 μg/mL氨苄青霉素的5 mL LB液体培养基中，于200 r/min、37 ℃条件下振荡培养，当$OD_{600}$达到0.6时，加入终浓度为0.1 mmol/L的IPTG诱导表达，继续培养12 h后，在4 ℃、10 000 r/min离心10 min收集菌体，菌体用PBS缓冲液重悬，经超声波破碎仪破碎后离心，分别得到破碎上清液和沉淀，通过聚丙酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析相关条带。

基于类弹性蛋白ELP受温度影响的可逆相变特性，采用可逆相变循环（Inverse transition cycling，ITC）法纯化重组融合蛋白ELP-Intein-MET。将离心收集诱导培养好的重组菌用PBS缓冲液重悬，超声破碎后，于4 ℃、12 000 r/min离心30 min，分离得到细胞破碎上清液，加入等体积的6.0 mol/L的NaCl溶液或者相对应浓度的固体NaCl，40 ℃水浴加热10 min后离心，弃去上清液；再用4 ℃预冷的PBS缓冲液重悬沉淀，在4 ℃冰箱中静置10 min后离心，收集上清液。以上为一轮ITC，根据纯化的效果进行多轮ITC。

### 1.4　重组融合蛋白的裂解条件优化

在PBS溶液中加入终浓度为40 mmol/L的Bis-Tris并用HCl溶液调节pH，分别制成pH为5.0、6.0、7.0、8.0、9.0的裂解液。用裂解液重悬经过可逆相变循环的沉淀启动融合蛋白的自裂解，分别在20、25、30、35 ℃下孵育0~36 h，在24 h后每2 h取样进行Tricine-SDS-PAGE验证，根据结果确定最佳裂解条件。

### 1.5　蜂毒肽的分离纯化

将收集的裂解液浓缩至100 μL，经过0.22 μm滤膜过滤后上样到经过PBS缓冲液平衡的Superdex Peptide 10/300 GL中。在215 nm波长下检测紫外吸收，收集峰样，进行浓缩，并用Tricine-SDS-PAGE电泳检测目标蛋白质。

### 1.6　蜂毒肽的抑菌活性分析

#### 1.6.1　牛津杯法测定抑菌活性

从*B. subtilis* 168、*S. aureus*和*E. coli* JM109培养平板上挑取单菌落转移至5 mL LB液体培养基，于37 ℃下培养，至$OD_{600}$为0.5时，将1 mL菌液加入冷却至50 ℃左右的200 mL琼脂培养基中进行稀释，吸取25 mL快速加到平板中使其平坦待凝，待上层培养基凝固后，将灭菌的牛津杯（8 mm×6 mm×10 mm）垂直竖立在平板标记附近，分别将200 μg/mL纯化蜂毒肽和200 μg/mL化学合成蜂毒肽加入牛津杯中，使用50 μg/mL氨苄青霉素作为阳性对照、$ddH_2O$作为阴性对照，将平板置于37 ℃恒温培养箱中孵育16~18 h，根据抑菌圈大小评估抑菌活性。

#### 1.6.2　稀释微量涂布法测定生长细菌的抑制活性

将*S. aureus*、*B. subtilis* 168和*E. coli* JM109培养至对数生长期，随后分别将每种菌株与蜂毒肽在96孔微孔板中一起孵育，使纯化蜂毒肽的终质量浓度为10 μg/mL，LB中培养的未处理菌株为空白对照，以10 μg/mL的氨苄青霉素用作生长抑制的对照，将培养物在37 ℃孵育2 h，10倍梯度稀释涂布至LB固体培养基，37 ℃培养过夜，通过活菌计数法来评估抑菌活性。

#### 1.6.3　最小抑菌质量浓度的测定

取*B. subtilis* 168、*S. aureus*、*E. coli* JM109在无抗LB固体平板上划线，过夜培养至单菌落长出。挑取单克隆于5 mL LB液体培养基中，37 ℃、200 r/min过夜培养。取适量过夜培养菌液接种于对应新鲜液体培养基中，调整菌落浓度，制成$10^5$ CFU/mL的菌悬液。96孔板各孔均加入100 μL新鲜无菌LB培养基，取100 μL质量浓度为200 μg/mL的纯化蜂毒肽加入

第 1 孔，连续两倍稀释到本列第 6 孔。前 7 孔均加入 10 μL 菌悬液，第 7 孔作为阳性对照，第 8 孔只加液体培养基作为阴性对照。每孔 3 个重复，振荡混匀 1 min 后于 37 ℃恒温培养 12 h。培养结束后，根据各孔 $OD_{600}$ 值计算抑菌率，见式（1）。

$$B_r=\frac{A_p-A_x}{A_p-A_n}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

$B_r$——抑菌率，%；

$A_p$——阳性对照组 $OD_{600}$ 值；

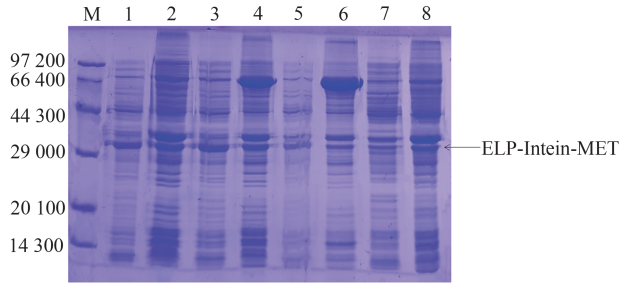
$A_x$——试验组 $OD_{600}$ 值；

$A_n$——阴性对照组 $OD_{600}$ 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒的构建和蛋白质表达

将构建成功的重组表达质粒 pET21a-ELP-Intein-MET 转入 *E. coli* BL21（DE3）菌株进行诱导表达，经过测序验证获得重组菌 *E. coli*/pET21a-ELP-Intein-MET。重组菌上清液经过 SDS-PAGE 分析，观察到一条明显的蛋白质表达条带（见图 2），与融合标签的蜂毒肽理论相对分子质量（33 200）一致。表明重组融合蛋白 ELP-Intein-MET 在大肠杆菌中成功实现可溶性表达。通过诱导温度优化，发现当诱导温度为 25 ℃时，重组菌株破碎上清液相对应的 SDS-PAGE 条带最粗，表明在 25 ℃条件下，融合蛋白 ELP-Intein-MET 可溶性表达水平最高。




M 表示标准相对分子质量；1、3、5、7 分别表示在 17、25、30、37 ℃下诱导的重组菌 *E. coli*/pET-21-ELP-Intein-MET 菌液上清液；2、4、6、8 分别表示在 17、25、30、37 ℃下诱导的重组菌 *E. coli*/pET-21-ELP-Intein-MET 菌液沉淀物。

图 2 重组蛋白在不同温度下的表达

Fig. 2 Expression of recombinant protein at different temperatures

### 2.2 融合蛋白 ELP-Intein-MET 的纯化

对重组菌 *E. coli*/pET21a-ELP-Intein-MET 破碎上清液按照 1.3 中的方法进行纯化。融合蛋白的逆转变温度 $T_t$ 受盐溶液浓度的影响，且加热时间和加热温度都会影响融合蛋白的纯化效果，因此对蛋白质纯化过程中的盐浓度、加热温度和加热时间进行了优化。通过两种不同的方式改变细胞破碎上清液中的 NaCl 浓度，如图 3（a）所示，两者均在最终盐浓度为 3.0 mol/L 时显示出相似的沉淀效果且此时沉淀效果最佳。考虑到过高的盐浓度引起溶解性差的问题，因此选择采用等体积盐溶液混合法来调整溶液中的盐浓度。

此后，对加热温度进行了优化，如图 3（b）所示，融合蛋白在 50 ℃加热时沉淀效果最佳。表明高温更有助于融合蛋白的沉淀，但是过高温度对蛋白质活性有较大影响，综合考虑，选取 40 ℃条件下对融合蛋白进行纯化。同时，探究了不同加热时间对融合蛋白纯化的效果，如图 3（c）所示，融合蛋白加热 10 min 时已经显著沉淀。综上，蛋白质纯化条件采用 40 ℃、6.0 mol/L 盐溶液混合条件下加热 10 min。

在最优条件下对融合蛋白进行纯化，将纯化蛋白质进行 SDS-PAGE 分析。如图 3（d）所示，获得了较为单一的蛋白质条带，蛋白质大小与融合蛋白理论相对分子质量（33 200）一致，表明在此条件下纯化能获得纯度较高的融合蛋白 ELP-Intein-MET。

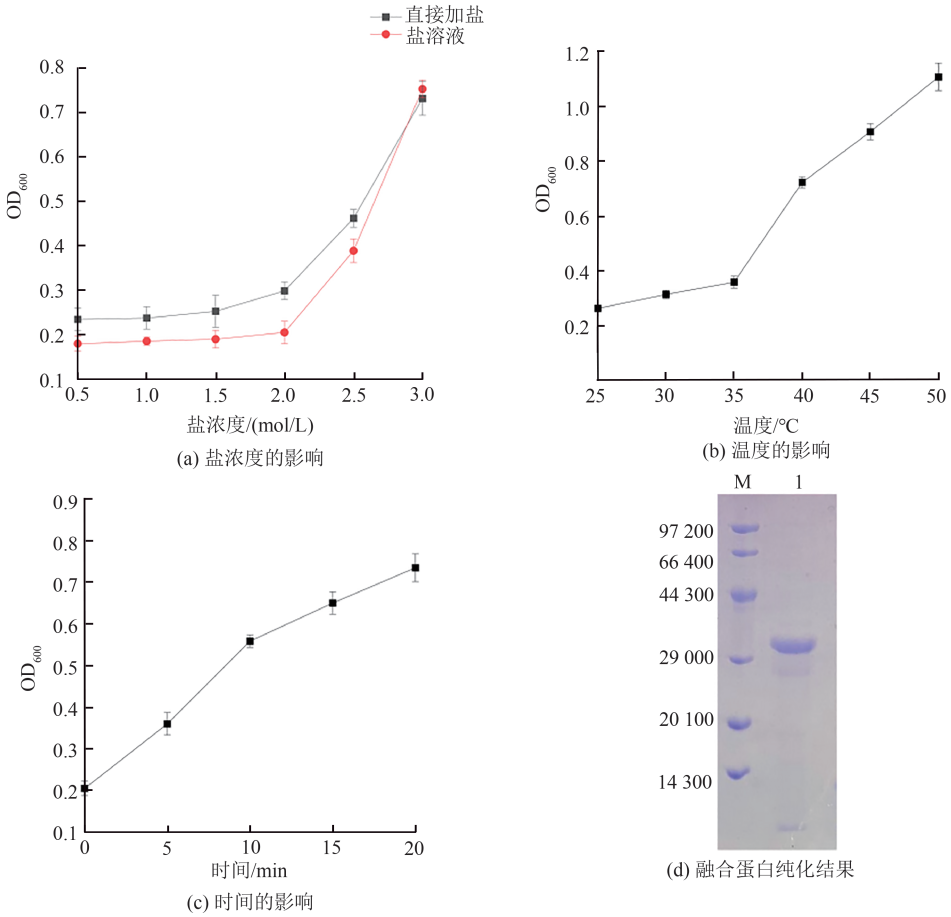
### 2.3 重组蛋白 ELP-Intein-MET 的自裂解

用裂解液重悬经 ITC 纯化的重组蛋白 ELP-Intein-MET，在室温放置过夜以实现蛋白质的自裂解。完成后离心分别取上清液和沉淀进行 Tricine-SDS-PAGE 分析。结果显示融合蛋白发生自裂解产生与 MET 大小相似的目的蛋白质。

对融合蛋白自裂解条件进行了 pH、温度和时间的优化。如图 4（a）所示，当裂解液 pH 大于 6.06，过夜自裂解效果明显，因此选择 pH 为 6.0、7.0、8.0 进行后续蛋白质自裂解条件的优化。如图 4（b）所示，在 25 ℃和 30 ℃时蛋白质自裂解速率显著高于其他条件。最后将 pH 与温度条件两两组合，从 24 h 开始每 2 h 取样进行 SDS-PAGE 分析，在 pH 7.0、30 ℃、32 h 时融合蛋白裂解最为彻底，见图 4（c）。

### 2.4 裂解液中非融合蜂毒肽的分离纯化

裂解生成的蜂毒肽与融合表达标签 ELP-Intein 的相对分子质量相差较大，并且蜂毒肽的相对分子质量仅为 2 800，因此需要进一步分离纯



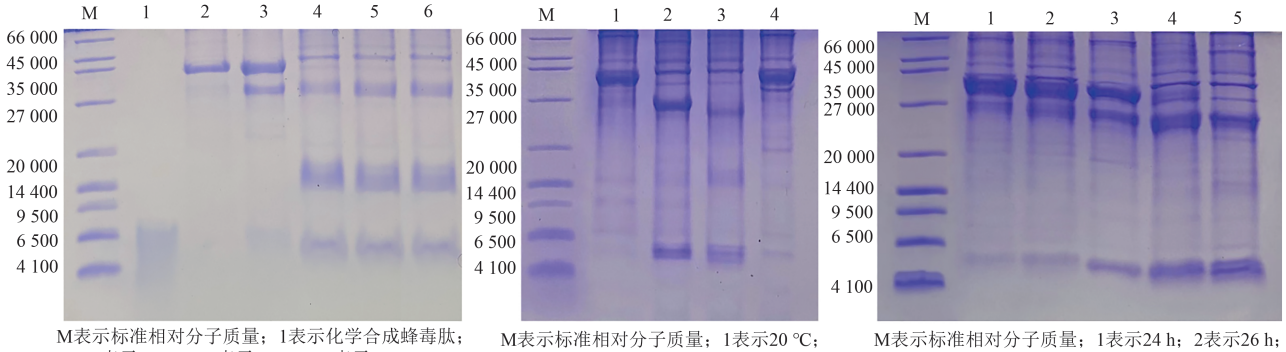

(a) 盐浓度的影响　(b) 温度的影响

(c) 时间的影响　(d) 融合蛋白纯化结果

M表示标准相对分子质量；1表示纯化融合蛋白；M表示蛋白质Marker。

图3　融合蛋白质纯化条件优化

Fig. 3　Optimization of fusion protein purification conditions




M表示标准相对分子质量；1表示化学合成蜂毒肽；2表示pH 5.0；3表示pH 6.0；4表示pH 7.0；5表示pH 8.0；6表示pH 9.0。

(a) 融合蛋白裂解pH条件优化

M表示标准相对分子质量；1表示20 ℃；2表示25 ℃；3表示30 ℃；4表示35 ℃。

(b) 融合蛋白裂解温度条件优化

M表示标准相对分子质量；1表示24 h；2表示26 h；3表示28 h；4表示30 h；5表示32 h。

(c) 融合蛋白裂解时间条件优化

图4　融合蛋白裂解条件优化

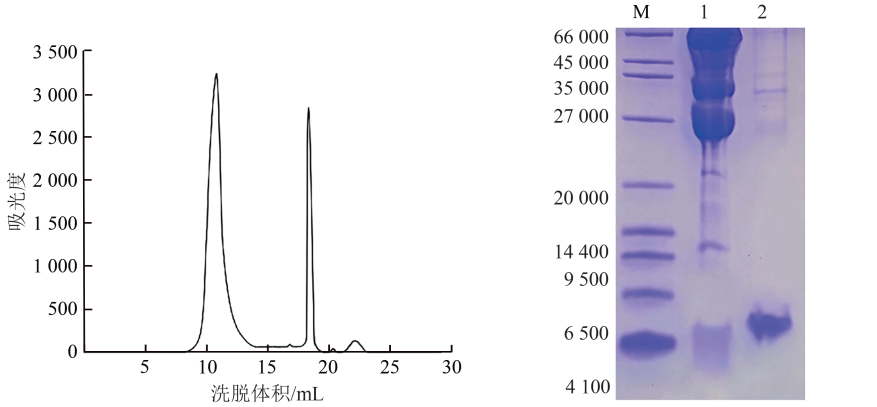
Fig. 4　Optimization of fusion protein cleavage conditions

化。将2.3中获得的裂解液浓缩后过膜作为样品，经Superdex Peptide 10/300 GL凝胶层析纯化，收集峰样用于Tricine-SDS-PAGE分析，如图5(a)所示，在洗脱体积为11.5 mL峰样中含有蜂毒肽与杂蛋白质，而在洗脱体积约为18 mL时的峰样中基本为纯化的蜂毒肽。经凝胶电泳成像仪分析显示蜂毒肽的纯度超过95%，见图5(b)。

### 2.5　蜂毒肽的抑菌活性测定

2.5.1　牛津杯法测定抑菌活性　*B. subtilis* 168、*S. aureus*和*E. coli* JM109作为测试菌株，通过牛津

杯实验测试纯化所得的重组蜂毒肽(rMET)的抗菌活性。如图 6 所示,在加入 100 μL 质量浓度为 200 μg/mL rMET 的条件下,革兰氏阳性菌 *S. aureus* 和 *B. subtilis* 168 及革兰氏阴性菌 *E. coli* JM109 的抑菌圈直径分别为 9.4、9.0、8.5 mm,且 rMET 对 *S. aureus* 和 *B. subtilis* 168 的抑菌圈显著大于($P$<0.05)对 *E. coli* JM109 的抑菌圈,纯化的 rMET 对 *E. coli* JM109 的抑菌性最弱,表明纯化的 rMET 对 *S. aureus*、*B. subtilis* 168 及 *E. coli* JM109 均有显著的抗菌作用,且其对革兰氏阳性菌株的抑制作用强于革兰氏阴性菌株。作者所获得的 rMET 与商品化 MET(cMET)对上述 3 种菌株的抑菌效果相似,说明 rMET 在抑菌活性上与商品化 MET 无明显差异。



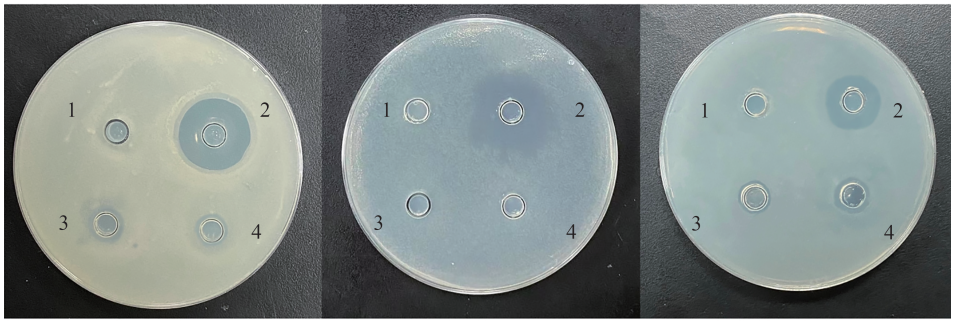

(a) 纯化峰图

M表示标准相对分子质量;1表示11.5 mL处峰样品;2表示18 mL处峰样品。

(b) 纯化产物Tricine-SDS-PAGE结果

图 5 裂解液中非融合蜂毒肽的分离纯化

Fig. 5 Isolation and purification of non-fused melittin in lysate




(a) *S. aureus* (b) *E. coli JM109* (c) *B. subtilis*

1 表示 $ddH_2O$;2 表示 Ampicillin;3 表示 cMET;4 表示 rMET。

图 6 纯化蜂毒肽的抑菌效果

Fig. 6 Antibacterial activity of melittin

2.5.2 微量稀释涂布法测定抑菌活性 在含有 LB 液体培养基的 96 孔微量培养板中进一步测试 rMET 对 *S. aureus*、*B. subtilis* 168 及 *E. coli* JM109 菌株生长的抗菌活性。如图 7 所示,质量浓度为 10 μg/mL 的 rMET 表现出显著生长抑制作用,对 *S. aureus*、*B. subtilis* 168 及 *E. coli* JM109 的抑菌率分别达到 97.6%、67.9%、46.1%,表明 *S. aureus* 对 rMET 最为敏感。而质量浓度为 10 μg/mL 的氨苄霉素对 *S. aureus*、*B. subtilis* 168 和 *E. coli* JM109 的生长抑制率为 100%、95.0%、49.8%。与 cMET 相比,纯化的 rMET 的抑菌活性稍微降低。上述抑菌试验结果与牛津杯抑菌试验结果一致,表明 rMET 对革兰氏阳性菌株的抑菌活性显著高于革兰氏阴性菌株。

2.5.3 rMET 对 3 种菌的最小抑菌质量浓度 由于 rMET 对 *S. aureus*、*B. subtilis* 168 及 *E. coli* JM1093

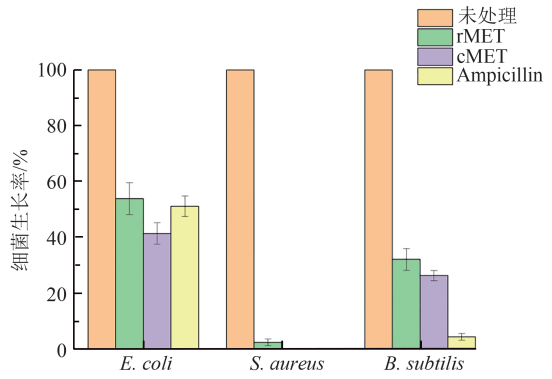



图 7　蜂毒肽对 *S. aureus*、*B. subtilis* 和 *E. coli* JM109 的生长抑制活性

Fig. 7　Antibacterial activity of melittin againstthe growth of *S. aureus*, *B. subtilis* 168 and *E. coli* JM109

菌株表现出不同的抗菌活性，推测可能是 rMET 的蛋白质质量浓度与 *S. aureus*、*B. subtilis* 168 及 *E. coli* JM109 的敏感性不同相关，因而进一步测定了 rMET 对 3 种实验菌株的最小抑菌质量浓度。结果如图 8 所示，随着 rMET 质量浓度的增加，这 3 种实验菌株的细胞生长抑制水平增加，rMET 对 *S. aureus*、*B. subtilis* 168 及 *E. coli* JM109 中的最小抑菌质量浓度分别为 12.5、50、100 μg/mL，表明 *S. aureus* 对 rMET 最敏感，而 *E. coli* JM109 对 rMET 抗性最强。

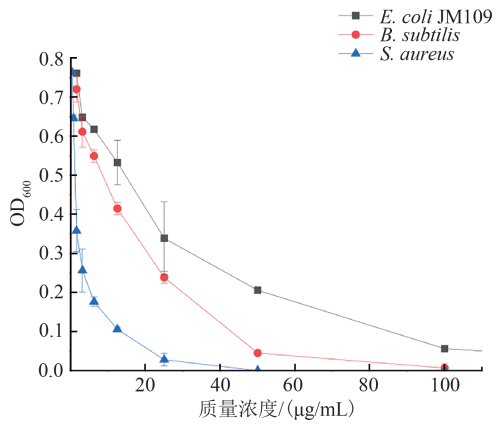



图 8　蜂毒肽的最小抑菌质量浓度

Fig. 8　Minimal inhibitory concentration of melitten

## 2.6　讨论

用蜂毒治病可以追溯到远古时代，自科学家用电泳法分离获得蜂毒肽以来，蜂毒肽的研究受到越来越多的关注。由于其在肿瘤治疗中的巨大潜力[20]，近年来蜂毒肽具有很好的发展前景。

从粗蜂毒中分离获取蜂毒肽的难点主要是蜂毒中的磷脂酶 A2（PLA2）相对分子质量大小与蜂毒肽四聚体相近，导致蜂毒肽纯度难以提高。但随着高效液相色谱的发展及其与其他提取工艺结合，蜂毒肽纯化的成本逐渐降低，且产量和纯度有所提高。Nguyen 等将反相高效液相色谱法应用于蜂毒肽的纯化，获得了高纯度蜂毒肽，同时首次对该方法进行了电化学和统计学评价[8]。

近年来，科学家们使用工程菌表达蜂毒肽融合蛋白并进行分离纯化。Chen 等构建了 pET-3c-SUMO-Melittin 质粒，实现可溶性表达后通过 Ni-NTA 层析法纯化了融合蛋白 SUMO-Melittin，在 SUMO 蛋白酶裂解 SUMO-Melittin 融合蛋白后再次用 Ni-NTA 纯化裂解后的样品，最终获得约 25 mg/L 的纯度大于 95% 的重组蜂毒肽[9]。周丽仙等先将麦芽糖结合蛋白 MBP 与蜂毒肽 MET 和前蜂毒肽 proMET 结合，构建并表达了融合蛋白 MBP-MET 和 MBP-proMET，通过 Ni 柱和 Dextrin sepharose HP 两步亲和纯化获得了纯度超 90% 的两种融合蛋白，但经过 TEV 酶切后会影响蜂毒肽活性[12]，为此构建了 pGEX-MET 质粒，将蜂毒肽与谷胱甘肽 S-转移酶（GST）标签融合，并在大肠杆菌中表达。通过 GST 高效亲和层析纯化融合蛋白 GST-MET、蛋白酶酶切、Superdex Peptide 10/300 GL 纯化，最终获得纯度大于 90% 的产量为 3.5 mg/L 重组蜂毒肽[10]。Moridi 等将蜂毒肽基因克隆到 pPIC9 载体中，转化并整合到毕赤酵母（*Pichia pastoris*）GS115 的基因组中，在 pH 6.0、体积分数 2% 甲醇的 BMM 培养基中培养 48 h 后蜂毒肽产量最高，经过 Vivaspin 20 分离相对分子质量大于 5 000 的蛋白质，纯化得到质量浓度为 105 μg/L 重组蜂毒肽，但纯度较低[21]。

传统蛋白质标签需要酶切处理，但内含肽具有自主剪切特性，在合适的条件下会自发断裂释放出目的蛋白质，纯化后能获得两端均不含多余氨基酸的蛋白质。而 ELP 的温度相变特性使融合蛋白纯化方法变得十分便捷，只需要简单的升温离心就可以获得高纯度融合蛋白。该体系在过氧化氢酶、麦芽糖结合蛋白、氯霉素乙酰转移酶等蛋白质的表达和纯化中得到了应用[22]。有学者构建了重组表达质粒 pET-EI-arasin-like Sp，融合蛋白在大肠杆菌中可溶性表达后通过反向转换循环

（ITC）从细胞裂解物中分离，并且通过内含肽的自切割和第二轮 ITC 进一步纯化获得了终产量为 3.56 mg/L 的重组蛋白[23]。

作者利用 ELP-Intein 系统在大肠杆菌中实现了 MET 的表达和纯化，构建了蜂毒肽的重组表达质粒 pET21a-ELP-Intein-MET，在大肠杆菌中诱导表达获得了可溶性融合蛋白 ELP-Intein-MET。对融合蛋白的可逆相变循环纯化条件进行了盐浓度、加热温度和加热时间的优化，最终在加入等体积浓度为 6 mol/L NaCl 溶液 40 ℃加热 10 min 的条件下，获得纯度超 90% 的融合蛋白。同时对融合蛋白自裂解条件进行了 pH、温度和时间优化，最优条件为在 pH 7.0、30 ℃条件下裂解 32 h。

Tricine-SDS-PAGE 结果显示，蜂毒肽的大小与其理论值相差较大，可能因为蜂毒肽带 6 个正电荷，与 SDS 形成的 SDS-蜂毒肽复合物在电泳中的迁移速率减慢，导致结果偏大。此外，蜂毒肽与 SDS 形成的复合物具有和 SDS 本身类似的电荷和大小，因此，Tricine-SDS-PAGE 的浓缩对于聚丙烯酰胺凝胶电泳过程来说也是一个问题，在实验中采用了低电压长时间完成浓缩阶段以获得更好的结果。

## 3 结论

作者将裂解液浓缩后使用 PBS 缓冲液平衡过的 Superdex Peptide 10/300 GL 凝胶进行层析，纯化获得 1.25 mg/L 纯度高于 95% 的无融合标签的蜂毒肽。纯化后的蜂毒肽用于 *S. aureus*、*B. subtilis* 168 和 *E. coli* JM109 的抑菌研究，发现其对革兰氏阳性菌的抑制作用强于革兰氏阴性菌，与商品化的蜂毒肽具有相似的抑菌活性。作者对重组蜂毒肽融合蛋白 ELP-Intein-MET 进行了构建与表达，从融合蛋白中分离得到无融合标签的蜂毒肽并验证了其抑菌活性，为蜂毒肽的工业化制备提供了依据。

## 参考文献


[1] HABERMANN E. Bee and wasp venoms[J]. Science, 1972, 177(4046): 314-322.

[2] PRATT J P, RAVNIC D J, HUSS H T, et al. Melittin-induced membrane permeability: anonosmotic mechanism of cell death[J]. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Animal, 2005, 41(10): 349-355.

[3] MIURA Y. NMR chemical shift analysis of the conformational transition between the monomer and tetramer of melittin in an aqueous solution[J]. European Biophysics Journal, 2016, 45(4): 347-354.

[4] MEMARIANI H, MEMARIANI M, MORAVVEJ H, et al. Melittin: a venom-derived peptide with promising anti-viral properties[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2020, 39(1): 5-17.

[5] 俞婷婷，马耀扬，俞家旺，等. 蜂毒肽抗炎作用及机制的研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报，2022，43(1)：72-77.
YU T T, MA Y Y, YU J W, et al. Research progress on the anti-inflammatory effect and mechanism of melittin[J]. Journal of Qiqihar Medical University, 2022, 43(1): 72-77. (in Chinese)

[6] HOOD J L, JALLOUK A P, CAMPBELL N, et al. Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity[J]. Antiviral Therapy, 2013, 18(1): 95-103.

[7] DUFFY C, SOROLLA A, WANG E, et al. Honeybee venom and melittin suppress growth factor receptor activation in HER2-enriched and triple-negative breast cancer[J]. NPJ Precision Oncology, 2020, 4: 24.

[8] NGUYEN H V, HEGER Z, KOMINKOVA M, et al. The electrochemical and statistical evaluation of isolation of mellitin and apamin from honey bee (*ApisMellifera*) venom[J]. International Journal of Electrochemical Science, 2015, 10(2): 1249-1260.

[9] CHEN Q C, LIU L, YU T Y, et al. High-level expression and purification of melittin in *Escherichia coli* using SUMO fusion partner[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2021, 27(1): 9-15.

[10] ZHOU L X, LIU Z Y, XU G Y, et al. Expression of melittin in fusion with GST in *Escherichia coli* and its purification as a pure peptide with good bacteriostatic efficacy[J]. ACS Omega, 2020, 5(16): 9251-9258.

[11] 孙丽萍，董捷，闫继红，等. 蜂毒肽的结构、功能及分子生物学研究进展[J]. 蜜蜂杂志，2002，22(8)：7-9.
SUN L P, DONG J, YAN J H, et al. Research progress on structure, function and molecular biology of melittin[J]. Journal of Bee, 2002, 22(8): 7-9. (in Chinese)

[12] 周丽仙，张荣珍，李利宏，等. 蜂毒肽在大肠杆菌中的高效融合表达与纯化[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(8)：26-33.
ZHOU L X, ZHANG R Z, LI L H, et al. High-efficiency fusion expression of melittin in *Escherichia coli* and its purification[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2020, 39(8): 26-33. (in Chinese)

[13] MEYER D E, CHILKOTI A. Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides[J].

Nature Biotechnology，1999，17(11)：1112-1115.

[14] CONLEY A J，JOENSUU J J，JEVNIKAR A M，et al. Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants[J]. Biotechnology and Bioengineering，2009，103(3)：562-573.

[15] TRABBIC-CARLSON K，LIU L，KIM B，et al. Expression and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli*：comparison of an elastin-like polypeptide fusion with an oligohistidine fusion[J]. Protein Science：a Publication of the ProteinSociety，2004，13(12)：3274-3284.

[16] WOOD D W，WU W，BELFORT G，et al. A genetic system yields self-cleaving inteins for bioseparations[J]. Nature Biotechnology，1999，17(9)：889-892.

[17] MATHYS S，EVANS T C，CHUTE I C，et al. Characterization of a self-splicing mini-intein and its conversion into autocatalytic N- and C-terminal cleavage elements：facile production of protein building blocks for protein ligation[J]. Gene，1999，231(1)：1-13.

[18] PERLER F B，XU M Q，PAULUS H. Protein splicing and autoproteolysis mechanisms[J]. Current Opinion in Chemical Biology，1997，1(3)：292-299.

[19] COOPER M A，TARIS J E，SHI C H，et al. A convenient split-intein tag method for the purification of tagless target proteins[J]. Current Protocols in Protein Science，2018，91：1934-3663.

[20] RADY I，SIDDIQUI I A，RADY M，et al. Melittin，a major peptide component of bee venom，and its conjugates in cancer therapy[J]. Cancer Letters，2017，402：16-31.

[21] MORIDI K，HEMMATY M，AKBARI EIDGAHI M R，et al. Construction，cloning，and expression of melittin antimicrobial peptide using *Pichia pastoris* expression system[J]. Gene Reports，2020，21：100900.

[22] BANKI M R，FENG L，WOOD D W. Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags[J]. Nature Methods，2005，2(9)：659-661.

[23] SOUSA D A，MULDER K C L，NOBRE K S，et al. Production of a polar fish antimicrobial peptide in *Escherichia coli* using an ELP-intein tag[J]. Journal of Biotechnology，2016，234：83-89.

（责任编辑：龚梦月）

（上接第46页）

[31] 岳翠男，秦丹丹，蔡海兰，等. 赣北工夫红茶滋味特征及关键化合物分析[J]. 食品与发酵工业，2021，47(2)：260-267.
YUE C N，QIN D D，CAI H L，et al. Taste characteristics and key compounds analysis of Congou black tea in northern Jiangxi province[J]. Food and Fermentation Industries，2021，47(2)：260-267. (in Chinese)

[32] 刘盼盼，郑鹏程，龚自明，等. 橘红茶香气特征及风味成分分析[J]. 食品科学，2021，42(8)：198-205.
LIU P P，ZHENG P C，GONG Z M，et al. Analysis of aroma characteristics and volatile components of Juhong tea，manufactured from black tea with added citrus peel[J]. Food Science，2021，42(8)：198-205. (in Chinese)

[33] 马玉青，方成刚，夏丽飞，等. 不同发酵程度对重萎凋“云抗10号”红茶香气成分的影响[J]. 西南农业学报，2020，33(4)：760-768.
MA Y Q，FANG C G，XIA L F，et al. Effect of different fermentation degree on aroma components of heavy withered ‘Yunkang No.10’ black tea[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences，2020，33(4)：760-768. (in Chinese)

[34] 杨霁虹，周汉琛，刘亚芹，等. 基于HS-SPME-GC-MS和OAV分析黄山地区不同茶树品种红茶香气的差异[J]. 食品科学，2022，43(16)：235-241.
YANG J H，ZHOU H C，LIU Y Q，et al. Differences in aroma components of black tea processed from different tea cultivars in Huangshan by using headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry and odor activity value [J]. Food Science，2022，43(16)：235-241. (in Chinese)

（责任编辑：许艳超）