

家蚕抗菌肽 moricin 在大肠杆菌中的融合表达 及抗菌活性测定

赵岩龙¹ 沈兴家^{1,2} 郭锡杰^{1,2}

(¹ 江苏科技大学, 江苏镇江 212003; ² 中国农业科学院蚕业研究所, 农业部家蚕生物技术重点开放实验室, 江苏镇江 212018)

摘要 Moricin 是家蚕中发现的一种抗菌肽, 对革兰氏阴性和阳性菌都有较强的抗菌活性, 具有良好的开发应用前景。为了建立一种大量表达和快速分离 moricin 的方法, 采用 PCR 拼接法获得 moricin 基因后重组到表达载体 pET-32M 上, 并在大肠杆菌 (*E. coli*) 中融合表达。表达产物存在于上清中为可溶状态, 经 Ni-NTA 柱纯化获得融合蛋白, 再经凝血酶 (thrombin) 酶切后过 2 次 Ni-NTA 柱获得纯度为 90% 以上的 moricin, 液相测定法表明纯化获得的 moricin 对大肠杆菌具有抗菌活性。

关键词 家蚕; 抗菌肽; Moricin; 融合表达; 抗菌活性

中图分类号 S881.2

文献标识码 A

文章编号 0257-4799(2008)02-0232-05

Fusion Expression and Test of Antibacterial Activity of the Antibacterial Peptide Moricin of *Bombyx mori* in *Escherichia coli*

ZHAO Yan-Long¹ SHEN Xing-Jia^{1,2*} GUO Xi-Jie^{1,2}

(¹ Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang Jiangsu 212003, China;

² The Key Laboratory of Silkworm Biotechnology, Ministry of Agriculture, Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang Jiangsu 212018, China)

Abstract Moricin is a novel antibacterial peptide from the silkworm (*Bombyx mori*) with activities against fungi and gram-positive and gram-negative bacteria. In order to establish an over-expressed and facilitated purification method, the moricin gene was obtained by a recursive PCR strategy using five overlap oligonucleotides and cloned into the expression vector pET-32M and expressed in *Escherichia coli* BL21. The expressed product was soluble in supernatant and the fusion protein was purified by Ni-NTA. After digested with thrombin and purified with other 2 times of Ni-NTA, moricin with a purity of over 90 percent was obtained. Liquid turbidity analysis indicated that the purified moricin exhibited the antibacterial activity.

Key words *Bombyx mori*; Antibacterial peptide; Moricin; Fusion expression; Antibacterial activity

抗菌肽 (antibacterial peptide) 是生物体内经诱导产生的一类具有生物活性的小分子多肽, 存在于

多种生物体中, 是宿主免疫防御系统的一个重要组成部分^[1-3]。抗菌肽能作用于革兰氏阴性菌 (G^-)、革兰氏阳性菌 (G^+)、真菌、寄生虫、癌细胞甚至是包膜病毒, 而绝大多数抗菌肽对哺乳动物正常细胞无害, 并且其杀菌机制与传统抗生素完全不同, 被学者们认为是一种天然抗生素而备受青睐。随着研究的不断深入, 越来越显示出了其在人类医学、兽医学等领域的独特应用价值^[2,3]。

迄今在家蚕 (*Bombyx mori*) 中已经发现多种抗菌肽, 如天蚕素 (cecropin) A、天蚕素 B、攻击素 (atta-

收稿日期: 2007-11-22

资助项目: 国家重点基础研究发展计划“973”项目 (编号 2005CB12-1000), 国家高技术研究发展计划“863”项目 (编号 2007AA100504), 江苏省高技术研究计划 (农业) 项目 (编号 BG2005302)。

作者简介: 赵岩龙 (1979-), 男, 内蒙古, 硕士研究生。

E-mail: ylzhaol2006@yahoo.com.cn

通讯作者: 沈兴家, 研究员, 博士生导师。

E-mail: shenxj63@yahoo.com.cn

cin) 和 moricin^[4,5]等。其中 moricin 是由 Hara 等^[4]于 1995 年首先在家蚕中发现,目前在其它昆虫中也发现了与其同源性很高的类似抗菌肽。家蚕中的 moricin 含 42 个氨基酸,是一种强碱性肽,对革兰氏阴性和阳性菌都具有较强的抗菌活性,且对革兰氏阳性菌的抗菌活性较天蚕素 B1 更高,可开发成为一种新型的抗菌剂^[4,6,7]。因此,建立一种大量表达和快速分离纯化 moricin 的方法具有重要的研究和应用价值。

尽管 moricin 只有 42 个氨基酸,但是由于 moricin 羧基末端几个氨基会形成特殊结构,很难通过化学合成法获得此抗菌肽^[6]。考虑到 moricin 亦是一种不具修饰氨基酸的线性肽,天然的 moricin 不含半胱氨酸,不存在折叠现象,而且 moricin 对宿主本身具有很强的毒性^[6-9],Hara 等^[6]通过在大肠杆菌中融合表达的策略纯化到了 moricin,但是其方法过于繁琐,不适合大量表达和快速纯化。因此,本实验参考了其它抗菌肽的表达纯化方法^[3,10-15],采用大肠杆菌融合表达系统表达 moricin,构建了硫氧还蛋白(Trx)与 moricin 的原核融合表达载体 pET-32M-Trx-moricin,实现了其在大肠杆菌 BL21 中的高效可溶性表达和快速纯化,纯化获得的 moricin 对大肠杆菌具有很强的抗菌活性,为进一步研究 moricin 的抗菌机制及开发应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21 及表达载体 pET-32M 为本实验室保存。KOD plus、*Bam*H I、*Xho* I、*T*₄ DNA ligase 购自 TaKaRa Biotech 公司。Tryptone、Yeast Extract 为 Oxoid 公司产品,SDS、Tris、Acrylamide、Bisacrylamide 等为 Sigma 公司产品,其余试剂为分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计 根据大肠杆菌基因翻译的偏爱密码子和抗菌肽 moricin 氨基酸的序列(GenBank Accession No. BAB13508)及 pET-32M 的多克隆位点,设计合成 P1、P2、P3、P4 和 P5 共 5 条引物用于拼接抗菌肽 moricin 基因,其中 P1 和 P2 分别带有 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点:P1, 5'-GCGGATCCGCAAAAATACCTATCAAGGCCATTAAGACT-3'; P2, 5'-GAACTCGAGTTAATGCTTTCTTTTCTTCGGTTTCAAGAAATT-3';

P3, 5'-ACCTTTACCGACTGCCTTTCCTACAGTCTTAA-TGGC-3'; P4, 5'-GGTAAAGGTCTAAGAGCCATCAATATCGCCAGTACA-3'; P5, 5'-TTTCAAGAAATTGAA-AACATCGTTGGCTGTACTGGC-3'。

1.2.2 家蚕 moricin 基因的拼接 分别以 P1、P3 和 P4、P5 互为模板和引物进行第 1 轮 PCR,反应条件:94 ℃ 5 min, 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增片段的大小,经割胶回收纯化目的片段。再以回收的第 1 轮 PCR 的产物为模板,以 P1 和 P2 为引物进行第 2 轮 PCR,反应条件:94 ℃ 5 min, 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。采用同样方法回收纯化目的片段,从而得到 moricin 基因。

1.2.3 表达质粒的构建与鉴定 第 2 轮 PCR 胶回收的产物(moricin 基因)和 pET-32M 均用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,酶切产物割胶回收后,在 16 ℃ 下用 *T*₄ DNA Ligase 连接过夜,连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。筛选获得重组子并进行 PCR 鉴定和测序鉴定。

1.2.4 融合蛋白的诱导表达 将鉴定正确的重组表达质粒 pET-32M-moricin 转化到宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)中,涂布于含氨苄青霉素(ampicillin, AMP)50 μ g/mL 的 LB 培养平板上,37 ℃ 培养过夜。次日挑单菌落培养,当 *OD*₆₀₀ 为 0.4~0.6 时,转接到大瓶培养,至 *OD*₆₀₀ 接近 0.8 时加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L 诱导,37 ℃ 培养 4 h。5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。超声破碎细胞,15 000 r/min 离心 10 min 收集上清。

1.2.5 亲和层析纯化家蚕抗菌肽 moricin 将上清加到 Ni-NTA 琼脂糖凝胶柱上,用缓冲液 A (50 mmol/L NaH₂PO₄, 0.5 mol/L NaCl, pH 8.0, 20 mmol/L 咪唑)洗去非特异结合的蛋白,然后用洗脱缓冲液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 0.5 mol/L NaCl, pH 8.0, 250 mmol/L 咪唑)洗脱,收集洗脱液并对缓冲液 B (20 mmol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl, pH 8.0)透析。在透析后的溶液中加入 80 μ L thrombin 酶 22 ℃ 酶切 20 h 左右,然后将酶切后的溶液再过 2 次 Ni-NTA 琼脂糖凝胶柱,Trx 部分挂在柱上,而 moricin 存在于穿液液中。收集含 moricin 的洗脱液,对水透析,然后冷冻抽干,-20 ℃ 保存。将冻干粉溶于无菌水进行 15% SDS-PAGE 分析。

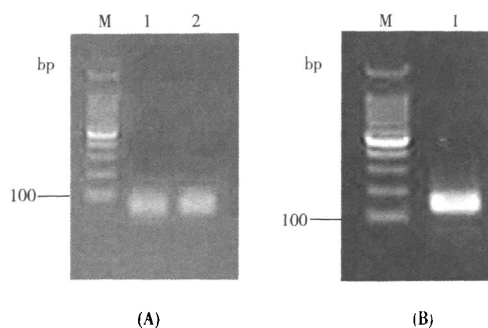
1.2.6 重组家蚕抗菌肽 *moricin* 抗菌活性检测

取处于对数生长期的 *E. coli* BL21 菌液 100 μL , 加入到含有 5 mL LB 液体培养基的试管中, 再分别加入 5、10 μL *moricin* (2.4 mg/mL)。以加无菌水作为阴性对照, 加 5 μL AMP 作为阳性对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 4 h 后观察 *E. coli* BL21 的生长状况。

2 结果与分析

2.1 家蚕抗菌肽 *moricin* 基因的克隆及重组表达质粒的构建

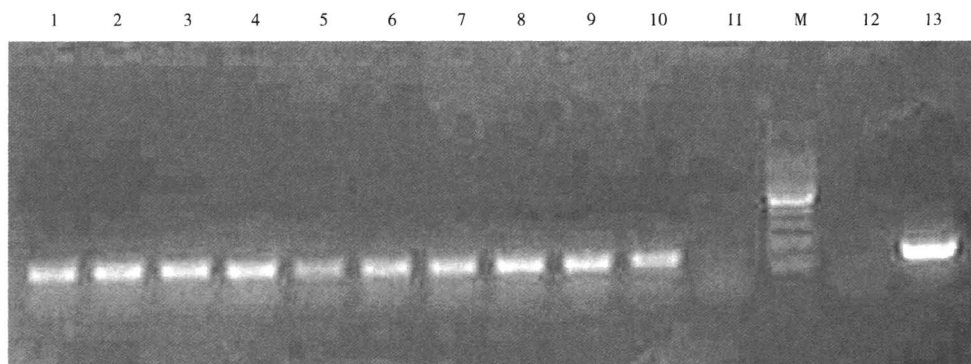
第 1 轮 PCR 获得家蚕抗菌肽 *moricin* 基因的 2 个片段, 条带大小为 80 bp 左右 (图 1-A); 第 2 轮 PCR 获得全长家蚕抗菌肽 *moricin* 基因, 条带大小为 140 bp 左右 (图 1-B)。将 *moricin* 基因与载体 pET-32M 相连, 转化 *E. coli* DH5 α 。在 AMP 抗性下筛选, 挑选 11 个克隆, 进行 PCR 鉴定, 结果如图 2 所示: 1-10 号克隆均为阳性, 11 号克隆为阴性。选取 3 号克隆测序, 结果序列与 GenBank 公布的序列 (NM_001043364) 完全一致。



A. 第 1 轮 PCR 产物, 泳道 1 由引物 P1、P3 PCR 扩增的产物, 泳道 2 由引物 P4、P5 PCR 扩增的产物 B. 第 2 轮 PCR 产物, 泳道 1 由引物 P1、P2, 并以回收的第 1 轮 PCR 的产物为模板 PCR 扩增的产物 M. DL 2 000 DNA 分子质量标准。

A. The products of the first PCR. Lane 1 is the product of PCR with P1 and P3 primers; Lane 2 is the product of PCR with P4 and P5 primers B. The product of the second PCR. Lane 1 is the product of PCR with P1 and P2 primers by using the product of the first PCR as the template M. DNA marker DL 2 000

图 1 家蚕 *moricin* 基因的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果
Fig.1 PCR products of *moricin* gene of *Bombyx mori* in agarose gel electrophoresis



M 为 DL 2 000 DNA 分子质量标准; 1-11 泳道以各加 1 μL 所挑克隆的菌液为模板, 引物 P1、P2 各 1 μL ; 12 泳道以加 1 μL ddH $_2$ O 为模板, 引物 P1、P2 各 1 μL ; 13 泳道以加 1 μL *moricin* 质粒为模板, 引物 P1、P2 各 1 μL 。

M. DNA marker DL 2 000; lane 1-11. the products of PCR with P1/P2 primers, template is 1 μL bacteria liquid;

lane 12. the products of PCR with P1/P2 primers, template is 1 μL ddH $_2$ O;

Lane 13. the products of PCR with P1/P2 primers, template is 1 μL *moricin* plasmid.

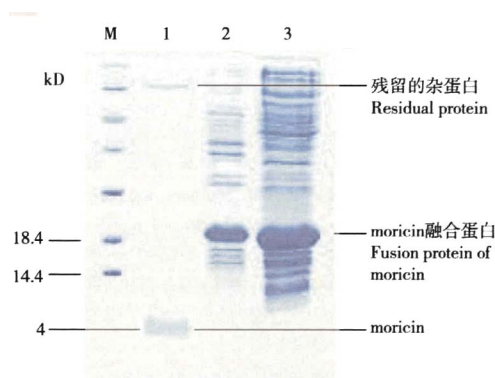
图 2 家蚕 *moricin* 基因重组质粒的 PCR 鉴定结果

Fig.2 PCR identification result of recombinant plasmids with *moricin* gene of *Bombyx mori*

2.2 融合蛋白的诱导表达和家蚕抗菌肽 *moricin* 的纯化

将经鉴定正确的重组质粒 pET-32M-*moricin* 转化宿主菌 *E. coli* BL21, 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 4 h, 低速离心收集菌

体,超声破碎后上清和沉淀分别作 SDS-PAGE 分析。结果在约 20 kD 位置处有明显的蛋白质条带,与预期的融合蛋白分子量一致,说明融合蛋白得到高效表达,而且主要以可溶形式存在。凝胶扫描分析表明,融合蛋白的表达量约占菌体总蛋白的 30%。离心后收集到的上清液进行 Ni-NTA 亲和纯化,用含 20 mmol/L 的咪唑洗脱后,融合蛋白全部挂在 Ni 柱上,杂蛋白基本被去除。加入 80 μ L 的 thrombin 酶(1 U/ μ L), 22 $^{\circ}$ C 酶切 20 h, moricin 从融合蛋白中被切下,用 10 mL 缓冲液 B 洗脱 Ni 柱,收集洗脱液,其中含有大量抗菌肽 moricin,而 Trx 仍挂在 Ni 柱上。取 20 μ L 洗脱液作 SDS-PAGE 分析,大约在 4 kD 左右有一条明显的条带,即为目的抗菌肽 moricin,另一分子质量很大的条带为残留的杂蛋白(图 3)。



M. 蛋白质分子质量标准 1. Thrombin 酶切后过 Ni-NTA 柱收集的洗脱液 2. 细菌细胞破碎后离心的沉淀物 3. 细菌细胞破碎后离心的上清

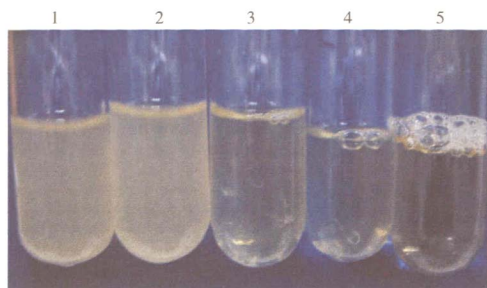
M. Protein marker 1. The fraction of the fusion moricin through Ni-NTA after digestion by thrombin 2. Insoluble fraction of ultrasonic lysate 3. Supernatant of ultrasonic lysate

图3 家蚕抗菌肽 moricin 纯化过程中的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis during the process of purification of antibacterial peptide moricin of *Bombyx mori*

2.3 家蚕抗菌肽 moricin 的抗菌活性检测

将纯化后的产物溶于无菌水,采用液相测定法检测抗菌活性。在刚加入 10 μ L 或 5 μ L (2.4 mg/mL) moricin 时 *E. coli* BL21 菌还可以生长繁殖,但是 4 h 后试管中的 *E. coli* BL21 菌全部死去;而对照组(加入无菌水)中的 *E. coli* BL21 菌生长正常,加入 AMP 的处理组则一直没有任何细菌生长(图 4)。



1,2. 加 10 μ L 无菌水 3. 加 10 μ L moricin (2.4 mg/mL)
4. 加 5 μ L moricin (2.4 mg/mL) 5. 加 5 μ L AMP
1-2. Add 10 μ L sterile H₂O
3. Add 10 μ L moricin (2.4 mg/mL)
4. Add 5 μ L moricin (2.4 mg/mL) 5. Add 5 μ L AMP

图4 加入家蚕抗菌肽 moricin 后 LB 试管中 *E. coli* BL21 细菌的生长情况

Fig. 4 Growth situation of *E. coli* BL21 in LB liquid media with the antibacterial peptide moricin of *Bombyx mori*

3 讨论

由于抗菌肽的广谱抗菌活性及其在免疫系统中的作用,在抗生素大量使用所引起的抗药性日益严重的形势下,全球掀起了一场研究抗菌肽的热潮,迄今已有近千种天然抗菌肽被分离出来,其中包括多种昆虫抗菌肽,如 cecropin、thanatin、lebobcin、moricin 等等。为了将抗菌肽开发成新一代抗菌药物,如何提高抗菌肽的产量及简化其纯化方法成为一个棘手的问题。近年来已有很多文献报道抗菌肽的大量表达、快速纯化方法。如张杰等^[11]成功的利用毕赤酵母表达系统大量表达纯化到抗菌肽 CM4;另外李保存等^[14]、Chen 等^[12]、Li 等^[10]在大肠杆菌表达系统中利用融合表达、亲和层析纯化等方法也成功的实现了抗菌肽的大量表达和纯化。

家蚕抗菌肽 moricin 自从 1995 年由 Hara 等^[4]发现以来,其广谱高强的抗菌活性已得到证实。Hara 等^[6]通过在大肠杆菌中融合表达的策略,也纯化到了 moricin,但是其方法过于繁琐,存在问题。首先 Hara 等^[6]是应用盐酸胍进行的变性纯化,对 moricin 的天然结构可能会有影响,其次纯化的过程需要经过分子筛、离子柱、HPLC 等多步纯化过程,蛋白损失过多,不适合大量表达和快速纯化。本实验通过融合表达的方式将人工合成的抗菌肽

moricin 基因克隆到 pET-32M 中, 利用载体上自带的硫氧还蛋白和强有力的 T7lac 启动子实现了 Trx 和 *moricin* 的高效表达, 而且融合蛋白主要以可溶状态存在于菌体中, 不形成包涵体, 采用非变性纯化方法, 有利于保持家蚕抗菌肽 *moricin* 的天然构象, 并易于纯化。另一方面, 由于融合蛋白带有 His 标签, 只需经过一步 Ni-NTA 纯化就可获得高纯度的融合蛋白。融合蛋白再通过 thrombin 的高效准确酶切, 将家蚕抗菌肽 *moricin* 从融合蛋白中切下, 再经 Ni-NTA 纯化即可获得的 *moricin*, 纯度能达到 90% 以上, 实现了快速纯化, 获得的家蚕抗菌肽 *moricin* 对大肠杆菌具有明显的抗菌活性。因此, 运用该重组表达系统, 可大量获得家蚕抗菌肽 *moricin*, 以满足其抗菌作用机制研究及大规模生产新型抗菌药物的需要。

参考文献 (References)

- [1] Boman H G, Hultmark D. Cell-free immunity in insects [J]. Annu Rev Microbiol, 1987, 41: 103 - 126
- [2] Bulet P, Stocklin R, Menin L. Anti-microbial peptides; from invertebrates to vertebrates [J]. Immunol Rev, 2004, 198: 169 - 184
- [3] Boulanger N, Bulet P, Lowenberger C. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites [J]. Trends Parasitol, 2006, 22(6): 262 - 268
- [4] Hara S, Yamakawa M. Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori* [J]. J Biol Chem, 1995, 270(50): 29923 - 29927
- [5] Morishima I, Suganaka S, Ueno T, et al. Isolation and structure of cecropins, inducible antibacterial peptides, from the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Comp Biochem Physiol B, 1990, 95(3): 551 - 554
- [6] Hara S, Yamakawa M. Production in *Escherichia* of moricin, a novel type antibacterial peptide from the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 220(3): 664 - 669
- [7] Yamakawa M, Tanaka H. Immune proteins and their gene expression in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Dev Comp Immunol, 1999, 23(4, 5): 281 - 289
- [8] Furukawa S, Tanaka H, Nakazawa H, et al. Inducible gene expression of moricin, a unique antibacterial peptide from the silkworm (*Bombyx mori*) [J]. Biochem J, 1999, 340(Pt 1): 265 - 271
- [9] Hemmi H, Ishibashi J, Hara S, et al. Solution structure of moricin, an antibacterial peptide, isolated from the silkworm *Bombyx mori* [J]. FEBS Lett, 2002, 518(1-3): 33 - 38
- [10] Li B C, Zhang S Q, Dan W B, et al. Expression in *Escherichia coli* and purification of bioactive antibacterial peptide ABP-CM4 from the Chinese silk worm, *Bombyx mori* [J]. Biotechnol Lett, 2007, 29(7): 1031 - 1036
- [11] 张杰, 吴希, 张双全, 等. 抗菌肽 CM4 基因克隆及其在毕赤酵母中的表达鉴定 [J]. 微生物学报, 2005, 45(5): 720 - 723
- [12] Chen Y Q, Zhang S Q, Li B C, et al. Expression of a cytotoxic cationic antibacterial peptide in *Escherichia coli* using two fusion partners [J]. Protein Expr Purif, 2008, 57(2): 303 - 311
- [13] Cheng T, Zhao P, Liu C, et al. Structures, regulatory regions, and inductive expression patterns of antimicrobial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori* [J]. Genomics, 2006, 87(3): 356 - 365
- [14] 李保存, 陈玉清, 张双全, 等. 中国家蚕抗菌肽 ABP-CM4 在 *E. coli* 中的融合表达及活性分析 [J]. 分子细胞生物学报, 2007, 40(2): 98 - 102
- [15] Oizumi Y, Hemmi H, Minami M, et al. Isolation, gene expression and solution structure of a novel moricin analogue, antibacterial peptide from a lepidopteran insect, *Spodoptera litura* [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1752(1): 83 - 92

作者: 赵岩龙, 沈兴家, 郭锡杰, ZHAO Yan-Long, SHEN Xing-Jia, GUO Xi-Jie
作者单位: 赵岩龙, ZHAO Yan-Long (江苏科技大学, 江苏, 镇江, 212003), 沈兴家, 郭锡杰, SHEN Xing-Jia, GUO Xi-Jie (江苏科技大学, 江苏, 镇江, 212003; 中国农业科学院蚕业研究所, 农业部家蚕生物技术重点开放实验室, 江苏, 镇江, 212018)
刊名: 蚕业科学 ISTIC PKU
英文刊名: SCIENCE OF SERICULTURE
年, 卷(期): 2008, 34(2)
被引用次数: 1次

参考文献(15条)

1. Boman H G, Hultmark D Cell-free immunity in insects 1987
2. Bulet P, Stocklin R, Menin L Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates 2004
3. Boulanger N, Bulet P, Lowenberger C Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites 2006(06)
4. Hara S, Yamakawa M Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, Bombyx mori 1995(50)
5. Morishima I, Suginaka S, Ueno T Isolation and structure of cecropins, inducible antibacterial peptides, from the silkworm, Bombyx mori 1990(03)
6. Hara S, Yamakawa M Production in Escherichia of moricin, a novel type antibacterial peptide from the silkworm, Bombyx mori 1996(03)
7. Yamakawa M, Tanaka H Immune proteins and their gene expression in the silkworm, Bombyx mori 1999(4-5)
8. Furukawa S, Tanaka H, Nakazawa H Inducible gene expression of moricin, a unique antibacterial peptide from the silkworm (Bombyx mori) 1999
9. Hemmi H, Ishibashi J, Hara S Solution structure of moricin, an antibacterial peptide, isolated from the silkworm Bombyx mori 2002(1-3)
10. Li B C, Zhang S Q, Dan W B Expression in Escherichia coli and purification of bioactive antibacterial peptide ABP-CM4 from the Chinese silk worm, Bombyx mori 2007(07)
11. 张杰, 吴希, 张双全 抗菌肽CM4基因克隆及其在毕赤酵母中的表达鉴定[期刊论文]-微生物学报 2005(05)
12. Chen Y Q, Zhang S Q, Li B C Expression of a cytotoxic cationic antibacterial peptide in Escherichia coli using two fusion partners 2008(02)
13. Cheng T, Zhao P, Liu C Structures, regulatory regions, and inductive expression patterns of antimicrobial peptide genes in the silkworm, Bombyx mori 2006(03)
14. 李保存, 陈玉清, 张双全 中国家蚕抗菌肽ABP-CM4在E. coli中的融合表达及活性分析[期刊论文]-分子细胞生物学报 2007(02)
15. Oizumi Y, Hemmi H, Minami M Isolation, gene expression and solution structure of a novel moricin analogue, antibacterial peptide from a lepidopteran insect, Spodoptera litura 2005(01)

相似文献(10条)

1. 期刊论文 SUN Wei, 孙伟, 沈以红, 向仲怀, 张泽 家蚕抗菌肽基因研究进展 -蚕业科学 2009, 35(1)
抗菌肽是昆虫先天性免疫系统中十分重要的效应因子, 近年来一直是昆虫免疫学研究的热点. 家蚕作为鳞翅目昆虫的代表, 其抗菌肽研究取得了长足进

展.根据已经研究获得的抗菌肽基因序列在家蚕基因组中进行同源搜寻,共获得了40个家蚕抗菌肽基因.这些基因编码的多肽在大小、氨基酸组成和性质上差异很大,但基于结构性质可以分成3类:(1)具有 α -螺旋结构并且缺乏半胱氨酸(cysteine,Cys)的线性抗菌肽;(2)富含脯氨酸或甘氨酸的组成性抗菌肽;(3)富含半胱氨酸的环形抗菌肽.以这3类结构作为主线,综述了家蚕抗菌肽近年来的研究进展.

2. 学位论文 [刘丽](#) [中国家蚕抗菌肽A I 基因片段的序列分析及CM<, IV>基因产物的杀菌、抗癌作用的研究](#) 1999

用胶体金标记中国家蚕抗菌肽CM<, IV>研究其杀菌、抗癌作用.结果表明,抗菌肽 CM<, IV>金标复合物首先附着于细菌表面,然后在膜上形成孔洞,造成细菌大量内容物外泄,致使细菌死亡;但抗菌肽并不一定以聚集物的形式进行作用,多个抗菌肽分子之间可能存在协同作用.抗菌肽CM<, IV>金标复合物多附着于癌细胞表面的微绒毛处,说明微绒毛参与了抗菌肽抗癌的作用过程.这可能是由于带正电荷的抗菌肽更易于与细胞表面许多带负电荷的糖分子结合,从而对癌细胞造成杀伤作用.中国家蚕抗菌肽A I 基因的序列结构目前国内未见报道.人们以天蚕抗菌肽cecropin A的前导肽氨基酸序列为基础设计5'端引物,用中国家蚕抗菌肽CM<, IV>的C-末端设计3'端引物.用双引物对进行二次PCR扩增法,从中国家蚕基因组DNA中分离出两个cecropin A基因拷贝,分别命名为抗菌肽A I 基因和抗菌肽A II 基因.对抗菌肽A I 基因片段进行测序,结果表明其序列与日本家蚕的Cec A I 基因互为同源基因.

3. 期刊论文 [鲍勇刚](#), [朱馨馨](#), [刘进](#), [马纪](#), [郑耀虎](#), [张海波](#), [张富春](#) [新疆家蚕抗菌肽\(Cecropin-XJ\)毕赤酵母高密度发酵条件的研究 -新疆大学学报\(自然科学版\)](#) 2004, 21 (3)

新疆家蚕抗菌肽具有明显的抑菌活性,利用基因工程技术生产新疆家蚕抗菌肽有助于实现工业化生产.本研究探索通过巴斯德毕赤酵母工程菌SMD1168高密度发酵生产新疆家蚕抗菌肽(Cecropin-XJ)的条件,包括培养基中碳源、氮源、初始pH值、磷酸盐等因素对毕赤酵母工程菌生长和抗菌肽分泌的影响.通过多因素正交实验确定了生产新疆家蚕抗菌肽高密度发酵培养的最适培养条件,条件优化后毕赤酵母工程菌发酵后密度OD600可达48.92士0.59,较优化前提高了3倍,为基因工程生产新疆家蚕抗菌肽奠定了基础.

4. 学位论文 [程廷才](#) [家蚕免疫系统相关基因的鉴定及其诱导表达模式研究](#) 2008

家蚕是典型的鳞翅目模式昆虫,也是一种完全依靠人类饲养才得以生存的重要经济昆虫,其基础研究有着良好的积累,并保存有大量的突变体及繁育系.对家蚕免疫相关基因的研究,不仅可以促进人们了解家蚕免疫应答的分子调控机制,也可以促进人们对昆虫的分子调控机制的理解,并为昆虫免疫分子的多样性研究提供线索.借鉴果蝇的免疫研究成果,利用家蚕基因组精细图、基因芯片和IEST等多种家蚕的数据资源,通过生物信息学分析,我们对家蚕的免疫系统相关基因进行了鉴定,对一些关键基因进行了比较和系统进化研究,重点探讨了它们的免疫诱导表达模式和功能,最后对家蚕免疫应答的分子机制进行探讨.获得的主要研究结果如下:

1. 家蚕的免疫系统相关基因
采用果蝇和按蚊所有免疫相关基因在家蚕基因组中进行同源性分析的方法,鉴定家蚕的免疫系统相关基因.我们鉴定了家蚕21个基因家族的218个免疫相关基因,主要包括:(1)模式识别受体,如PGRP、GNBP、凝集素和清道夫受体等基因家族;(2)4个信号传导途径的相关基因:如Toll途径的Spz、Toll、MyD88、Pelle、Tube、TRAF2和Cactin, Imd途径的FADD、Dredd、TAK1、TAB、IKK β 、IKK T和Relish, JAK/STAT途径的Domeless、Hopsotch和STAT;(3)7类抗菌肽家族的基因.其中,大约65%的基因具有EST表达证据;大约90%的基因已经定位到相应的染色体上,这为将来的基因功能研究提供了重要信息.系统进化分析发现家蚕的免疫相关基因在昆虫中都保守.受到识别受体和抗菌肽基因则有明显的物种特异性.在家蚕基因组中具有多个物种特异的拷贝,序列分化和物种特异的基因重复现象明显,暗示它们受到更大的环境选择压力.同时,发现45个家蚕-果蝇-按蚊-蜜蜂的1:1:1:1的直系同源基因,其中,信号传导途径的基因都显示1:1:1:1直系同源关系,推测家蚕拥有与果蝇等其它昆虫类似的免疫应答信号传导机制.

2. 基于全基因组芯片的免疫诱导表达谱分析
本研究运用包含22987个基因探针的全基因组芯片,通过大肠杆菌(革兰氏阴性细菌)和苏云金芽孢杆菌(革兰氏阳性细菌)诱导5龄第3天家蚕幼虫,在4个时间点对脂肪体进行了转录组比较分析.芯片扫描结果显示,总共有9961个探针有表达信号(信号值>400),占总探针数的43.3%,与此前的组织芯片结果相似.采用ratio>2倍的标准筛选差异表达基因,我们获得了210个上调表达的基因和200个下调表达的基因.通过基因功能分类,结果显示上调表达的基因主要是免疫应答相关基因,包括模式识别受体、抗菌肽基因、丝氨酸蛋白酶及其抑制剂相关基因、黑化级联相关基因和调降铁元素代谢的基因等.而下调表达的基因主要是一些能量代谢和生化酶类基因,包括细胞色素P450超家族的基因、表皮蛋白基因、低密度脂蛋白、激素相关基因、动力相关蛋白编码基因,以及与常规代谢有关的酶基因等.这种表达模式反映了昆虫脂肪体组织作为免疫应答器官的生理特征.

3. 家蚕的Toll相关受体基因家族
Toll受体在先天免疫和发育中具有重要作用,它们含有胞外亮氨酸富集结构域和胞内的TIR结构域,在昆虫和脊椎动物中都非常保守.通过与果蝇的Toll受体比较,发现家蚕基因组中含有13个Toll样受体,分别命名为BmToll1、BmToll1-2到11、BmToLK-1和BmToLK-2.染色体定位显示有8个成员位于第23号染色体上,其中BmToll1、BmToll1-2和BmToll1-7是家蚕特有的亚群.系统进化分析发现,家蚕的Toll受体与其它昆虫的基因明显形成7个进化亚群,其中,BmToll1-6、BmToll1-8和BmToll1-9与果蝇和按蚊的基因呈明显的直系同源关系.通过组织和发育时期的基因芯片数据分析,结果表明BmToll1和BmToll1-2在卵巢中富集表达,暗示其可能在胚胎发育中起重要作用;而BmToll1-2和BmToll1-4在幼虫的中肠富集表达,推测它们可能参与免疫防御.另外,BmToll1-10和BmToll1-11和BmToLK-2在精巢特异表达暗示它们可能与性别特异的生物学功能有关.同时,我们采用RT-PCR技术检测了10个Toll1基因在大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白菌菌诱导下的表达谱,结果显示绝大多数基因存在表达差异.如在注射大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的样品中BmToll1的表达明显被抑制;而BmToll1-2则是在注射大肠杆菌和白菌菌的样品中表达量明显下调.相反,BmToll1-3的表达量在三组诱导样品中都明显上调.家蚕Toll1受体的鉴定和表达谱分析,将为我们研究Toll1相关受体的生物学功能和Toll1信号传导途径的分子机制提供帮助.

4. 家蚕的抗菌肽基因家族
通过与已报道的昆虫抗菌肽的同源性分析,我们发现家蚕基因组总共包含有39个抗菌肽基因,包括12个Morcicins、12个Cecropins、7个Gloverins、3个Attacins、2个Lebocins、2个Enbocins和1个Defensin.其中,Moricin和Gloverin为鳞翅目昆虫特有的抗菌肽基因家族,并且成簇分布在基因组上.序列相似性和染色体定位信息表明,家蚕的抗菌肽基因是由祖先基因经历了多次复制产生的基因家族.而这种物种特异的基因复制现象有可能反映了抗菌肽基因在免疫系统中起着非常关键的作用,因而产生多个基因拷贝以抵御不同的病原微生物.

5. 家蚕抗菌肽基因的系统进化和诱导表达模式
家蚕基因组包含了比其它昆虫更多的抗菌肽基因,其中Moricin、Cecropin和Gloverin等三个基因家族都含有多个拷贝.通过计算编码序列的同义突变和非同义突变,发现这些基因家族的同义突变/非同义突变(dN/ds)都小于1,分别为0.637、0.487和0.202,并且信号肽的比值比成熟肽的比值明显更大,暗示了成熟肽趋于更强的稳定性选择.在这三个家族中,受到的进化选择压力大小关系为Moricin<Cecropin<Gloverin.结合抗菌谱和诱导表达活性的差异分析,发现选择压力小的Moricin和Cecropin家族成员之间的抗菌谱和诱导表达活性的差异明显比Gloverin家族的更大.二级和三级结构预测显示,Moricin和Cecropin家族都由 α -螺旋组成,而正选择位点也主要位于该区域.

通过家蚕抗菌肽的抗菌活性和诱导表达差异与序列差异的关联分析,我们可以得出如下推论:家蚕抗菌肽基因家族可能存在主要抗菌功能基因的强免疫诱导模式.家蚕的抗菌肽Moricin、Cecropin和Gloverin基因可能通过不等交换产生多拷贝基因家族.并且在与微生物的协同进化过程中,抗菌肽基因的编码序列受到不同的选择压力,导致部分氨基酸的改变,从而改变抗菌肽的分子结构和相应的静电势.这些变化最终导致抗菌肽家族成员间的抗菌谱和抗菌活性的差异.例如,Cecropin家族和鳞翅目特异的Moricin家族是由序列差异导致抗菌活性和诱导表达差异的典型家族,BmcecBJ、BmcecD和BumorAI等三个基因都具有高抗菌活性和高诱导表达的特点,推测它们可能承担了主要的抗菌功能,其它成员可能具有协同抗菌功能.而鳞翅目特异的Gloverin家族的序列分化比前两个家族小,功能上的分化也不如它们明显,并不完全符合高抗菌活性和高诱导表达的规律.例如,Bmg1vA2符合高抗菌活性和高诱导表达的规律,而Bmg1vB具有较高的抗菌活性,但是诱导表达水平却相对最低.家蚕抗菌肽基因家族的这种特征可能为基因家族的分子进化以及功能分化的理解和由复制而来的新基因的命运提供了一个很好的研究模式.

6. 家蚕抗菌肽基因表达的调控网络
综合上述分析,初步提出家蚕的抗菌肽基因表达调控网络,其步骤大致可分为4个:首先,家蚕在受到细菌感染时,模式识别受体PGRPs和IGNBPs对感染信号进行识别,并通过胞外的丝氨酸蛋白酶级联激活家蚕的Sp(a)tzle基因.其次,活化的Sp(a)tzle基因激活Toll1受体,或者通过PGRP大型受体激活胞内的Imd蛋白,把胞外的感染信号传递到胞内.再次,通过胞内信号级联反应,激活家蚕的NF- κ B类转录调控因子BmRel或BmRelish.最后,激活的转录因子进入细胞核,与抗菌肽基因的上游调控序列结合,高效启动家蚕的抗菌肽基因表达.

5. 期刊论文 [刘忠渊](#), [张富春](#), [蔡伦](#), [赵干](#), [单文娟](#), [钟哲](#), [王宾](#) [新疆家蚕抗菌肽\(Cecropin-XJ\)特性的研究 -新疆农业](#)

探讨了新疆家蚕抗菌肽 (Cecropin-XJ) 的抗菌特性. 根据琼脂糖孔穴扩散法, 检测抗菌肽的热稳定性、抑菌效价、对氨基青霉素抗性菌的抑菌作用, 检测抗菌肽对酸碱盐、人造胃液的耐受性及其抗菌谱. 结果表明新疆家蚕抗菌肽 (Cecropin-XJ) 具有很强的热稳定性、能够杀灭氨基青霉素抗性菌、对酸碱盐、人造胃酸有一定的耐受性, 其杀菌活力为: $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 抗菌肽与 24 000 单位的氨基青霉素杀菌活力相当. 新疆家蚕抗菌肽能够杀灭革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌, 而对革兰氏阳性菌的抗菌活力高于革兰氏阴性菌, 这一发现将为抗菌肽在农业、医疗卫生、畜牧业等方面的应用奠定基础, 同时为深入研究抗菌肽作用机制提供了依据.

6. 期刊论文 [刘忠渊. 张富春. 蔡伦. 赵干. 王宾. 酵母菌中表达的新疆家蚕抗菌肽 \(Cecropin-XJ\) 的特性研究](#) -微生物学报2003, 43 (5)

研究酵母菌中表达的新疆家蚕抗菌肽 (Cecropin-XJ) 的抗菌特性. 根据琼脂孔穴扩散法, 检测抗菌肽的热稳定性、抑菌效价、对氨基青霉素抗性菌的抑菌作用, 并检测了抗菌肽对酸碱盐、人造胃液的耐受性及其抗菌谱. 结果显示新疆家蚕抗菌肽具有很强的热稳定性、能够杀灭氨基青霉素抗性菌、对酸碱盐、人造胃酸有一定的耐受性, 其杀菌活力为: 1mg 抗菌肽与 1200U 的氨基青霉素杀菌活力相当. 新疆家蚕抗菌肽能够不同程度地杀灭革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌, 这一发现将为抗菌肽在农业、医疗卫生、畜牧业等方面的应用奠定基础, 同时为深入研究抗菌肽作用机制提供了依据.

7. 学位论文 [蒙炳超. 内源性抗菌肽基因的过量表达对家蚕抗病力影响的研究](#) 2009

昆虫抗菌肽是昆虫免疫诱导产生的一系列小分子多肽, 对昆虫的抗病能力起着重要的作用. 昆虫抗菌肽具有杀菌能力强、抗菌谱广等特点, 而引起人们的普遍关注. 家蚕作为支撑蚕丝产业的重要经济昆虫, 因此提高其抗病性的研究对提高蚕丝生产有着重要的意义. 家蚕是鳞翅目昆虫中的模式生物, 国内外研究者已经对家蚕的抗菌肽做了大量的研究工作, 发现家蚕中存Cecropin、Moricin、Attacin、Defencin、Gloverin、Lebocin这六大类抗菌肽基因, 这些基因对家蚕的抗病能力应该发挥着重要的作用. 近年来, 随着基因工程技术的发展, 通过转基因手段培育抗病性强的新品种成为新的育种研究方向, 人们把昆虫抗菌肽基因导入动植物染色体, 已经获得了抗病性强的转基因动植物, 为选育高抗性的动植物品种作出了重要的探索.

本研究基于本实验室构建的家蚕转基因技术平台, 选择对革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌有抗菌活性的家蚕Moricin2基因 (NCBI LOCUS:AB006915. 1) 和对革兰氏阴性菌有抗菌活性的家蚕Lebocin3基因 (NCBI LOCUS:AB003035), 构建转基因表达载体并导入家蚕基因组中, 探索转内源性抗菌肽基因后对家蚕抗菌能力和生长发育的影响. 本研究获得的如下结果:

1. 抗菌肽转基因表达载体的构建

将主要在家蚕脂肪体表达的SDH启动子与Moricin2基因构建成融合转基因表达载体pBac[3×P3-EGFP+SDH-Mor]; 将Lebocin3基因分别与SDH启动子或在家蚕全身广谱表达的IE1启动子构建成两个融合转基因表达载体, 即pBac[3×P3-DsRed+IE1-Leb]和pBac[3×P3-DsRed+SDH-Leb]。

2. 转基因蚕的制作与分子检测

将构建好的pBac[3×P3-EGFP+SDH-Mor]、pBac[3×P3-DsRed+IE1-Leb]和pBac[3×P3-DsRed+SDH-Leb]3个转基因表达载体通过蚕卵显微注射后, 在G1代进行荧光筛选, 分别得到40、30、36头荧光蚕。

对每个阳性转基因家蚕品系随机抽取一个个体进行Southern blot检测, 分析结果表明, 目的基因表达盒都已经整合到家蚕基因组上, 即成功构建了SDH-Mor、IE1-Leb和SDH-Leb转基因系。

3. 转基因家蚕中Moricin2和IE1-Lebocin3抗菌肽基因的表达分析

抽提3个转基因系和对照的脂肪体总RNA, 合成cDNA后进行半定量RT-PCR检测, 结果表明: (1) SDH-Mor和对照脂肪体中Moricin2基因mRNA的相对表达量分别为0. 72±0. 018和0. 43±0. 0093, Moricin2基因mRNA相对表达量提高差异极显著; (2) IE1-Leb、SDH-Leb和对照脂肪体中Lebocin3基因mRNA的相对表达量分别是0. 73±0. 015、0. 71±0. 017和0. 42±0. 0091, 两个转基因系中Lebocin3基因mRNA的相对表达量比对照显著提高, 但是两个转基因系间差异不显著。

4. 转基因蚕的抗菌能力分析和生长发育情况观察

对SDH-Mor转基因系和对照2龄起蚕添食苏云金芽孢杆菌, 试验结果表明, 当苏云金芽孢杆菌浓度为 1.25×10^8 个/mL, 时, SDH-Mor转基因系比对照对苏云金芽孢杆菌的抗性提高了约24. 4%。

对IE1-Leb转基因系和SDH-Leb转基因系与对照2龄起蚕添食E. coli, 实验结果显示, 当E. coli浓度为 1.4×10^9 个/mL时, IE1-Leb转基因系和SDH-Leb转基因系对E. coli的抗性比对照分别提高了约20. 57%和13. 9%。

对转基因家蚕的生长发育情况进行观察, 没有发现明显的异常现象。

8. 期刊论文 [范涛. 代君君. 周业奉. 魏国清. 范后文. 肖林珍. 吴传华. 王储炎. 田善富. Fan Tao. Dai Junjun. Zhou](#)

[Yefeng. Wei Guoqing. Fan Houwen. Xiao Linzhen. Wu Chuanhua. Wang Chuyan. Tian Shanfu](#) 家蚕抗菌肽的诱导及其抑菌作用研究 -中国农学通报2009, 25 (21)

家蚕抗菌肽是存在于家蚕及蚕蛹的血淋巴内具有抗菌活性的多肽物质. 在家蚕的天然免疫中起到至关重要的作用. 采用不同剂量的 γ -射线照射家蚕、对家蚕进行饥饿、电击和注射大肠杆菌等诱导处理后, 提取家蚕抗菌肽, 测定其抑菌效果. 结果表明: 以上的处理均能有效诱导抗菌物质的产生, 其中饥饿法处理的家蚕产生抗菌肽的抑菌活性最强. 研究结果为家蚕的综合利用提供了一种新的途径.

9. 学位论文 [吴希. 重组家蚕抗菌肽CM4抗真菌作用机理的研究](#) 2006

抗菌肽是体内先天免疫所产生的小分子物质, 它们种类繁多, 家族庞大, 对细菌, 真菌, 病毒, 原虫及癌细胞等都具有抑杀能力. 灵活快速是抗菌肽发挥作用的一个特点。

昆虫中不含半胱氨酸的线性 (Cecropin) 家族是最早发现的一类抗菌肽. 抗菌肽CM4是由张双全等人从中国家蚕中诱导获得的线性、 α -螺旋肽, 已证明CM4是Cecropin家族中的一个成员. 本实验室已经对抗菌肽CM4杀伤细菌及癌细胞的作用机理进行了深入的研究, 但对CM4抗真菌的机制研究较少。

本论文利用毕赤酵母表达的重组家蚕抗菌肽CM4, 通过一系列的细胞及分子水平的实验研究, 试图探索抗菌肽CM4完整的抑杀真菌的机理, 挖掘抗菌肽潜在的功能, 并为抗菌肽最终开发成抗菌药物提供一定的依据。

我们通过孔穴法抗真菌实验, 从十几株真菌中筛选了部分对抗菌肽CM4较敏感的菌株, 最终以黑曲霉和绿色木霉等作为研究对象. 细胞水平上, 扫描电镜, 透射电镜和激光共聚焦观察都显示, 抗菌肽处理的真菌外部形态和内部结构都发生了很大的变化, 出现了畸形, 破裂, 断裂等现象. 由于具有两亲性的 α 螺旋, 抗菌肽CM4分子可能首先通过插入双层脂膜而破坏了真菌的膜结构, 其次进入细胞内, 使细胞器和细胞骨架造成了不同程度的损坏。

在以上工作的基础上, 我们又进一步从分子水平研究了抗菌肽CM4对真菌的作用机制. 凝胶阻滞实验证明, 抗菌肽能与真菌的DNA和RNA结合, 影响了它们在电泳中的迁移率, 同时还能使核酸受到破坏, 断裂为大小不等的片断. 因而真菌细胞的代谢过程受到破坏, 最终导致了真菌的死亡。

我们最后还通过抗菌肽对细菌及真菌作用机理的比较, 为全方位了解抗菌肽CM4的杀菌作用机理, 提供了一定的理论基础。

10. 期刊论文 [刘忠渊. 金芝赛. 郑树涛. 徐涛. 张富春. LIU Zhong-Yuan, JIN Zhi-Sai, ZHENG Shu-Tao, XU Tao, ZHANG](#)

[Fu-Chun](#) 新疆家蚕抗菌肽抗菌作用的超微结构观察及抗菌机理初探 -动物学杂志2008, 43 (2)

为探讨基因工程表达的新疆家蚕 (*Bombyx mori*) 抗菌肽 (cecropin-XJ) 的抗菌机制, 通过紫外分光光度法研究抗菌肽的抑菌动力学, 并采用透射电镜观察抗菌肽作用于金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 后的超微结构, 对抗菌肽抗菌机理进行初步探讨. 结果表明, 抗菌肽抑菌作用比较明显, 抗菌肽的活性与作用时间有关. 抗菌肽可能是通过“桶-板”模式渗透细胞膜, 从而影响细胞膜的结构和功能, 使细胞膜形成许多孔道, 增强了金黄色葡萄球菌细胞的通透性, 造成细胞内的原生质扩散, 并从孔道向胞外渗漏, 影响了细菌的代谢系统, 从而起到抑菌、杀菌作用. 抗菌肽使金黄色葡萄球菌细胞内容物大量渗漏而死亡, 死亡细胞的细胞壁保持完整. 表明细胞膜是抗菌肽作用的主要靶位点.

引证文献(1条)

1. [孔卫青](#), [杨金宏](#) [家蚕moricin基因家族的诱导表达](#)[期刊论文]-[安徽农业科学](#) 2009(19)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_canyekx200802008.aspx

授权使用: 卞庆祥(wfjskjdx), 授权号: 5a7895e4-b0eb-404f-a1b4-9e38017b4394

下载时间: 2010年11月24日