

6× His-tag 在抗菌肽表达纯化中的应用 及其对抗菌肽活性的影响

牛明福¹, 李翔¹, 邢广旭², 张红梅¹, 官强¹

(1. 河南科技大学, 河南 洛阳 471003; 2. 河南省农业科学院 河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 为方便抗菌肽的体外表达和纯化,以蝎子防御素为对象,在其编码基因末端加入 6× His-tag,在酵母表达系统中表达,获得有活性的防御素 Sd 和融合蛋白 Sd-His。进一步纯化、体外抑菌活性及热酸稳定性等试验发现,6× His-tag 不但没有降低防御素的抑菌活性,反而有稍微的增强趋势。结果表明,6× His-tag 可用于抗菌肽的融合表达且不影响其活性,为抗菌肽的表达纯化提供了一个更简便有效的方法。

关键词: 6× His-tag; 抗菌肽; 表达纯化; 抑菌活性; 热酸稳定性

中图分类号: S816.73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)12-0121-04

Application of 6× His-tag in the Expression of Antibacterial Peptide and its Effect on the Antibacterial Activity

NIU Ming-fu¹, LI Xiang¹, XING Guang-xu², ZHANG Hong-mei¹, GONG Qiang¹

(1. Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

2. Henan Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: For the convenience of expression and purification of antimicrobial peptides *in vitro*, the scorpion defensin gene (*sd*) and the gene fused with 6× His-tag (*sd*-His) were reconstructed and expressed in *P. pastoris*. The two peptides were purified and then the antibacterial activity, thermal and acid stability were detected *in vitro*. Surprisingly, the antibacterial activity of Sd-His had not been reduced but slightly enhanced. The results indicate that 6× His-tag can be used for the fusion expression of antimicrobial peptide without affecting its activity. This study provides a simple and efficient method for the expression and purification of antimicrobial peptide.

Key words: 6× His-tag; Antimicrobial peptides; Expression and purification; Antibacterial activity; Stability

抗菌肽(antimicrobial peptides)是指多种生物体内诱导产生的一类具有广谱抗菌活性的小分子多肽,是从昆虫免疫后的血淋巴细胞中发现的一类碱性多肽类物质,是生物先天性免疫的重要组成部分^[1]。由于微生物耐药性的增加,目前临床上使用抗生素显得力不从心^[2],而抗菌肽具有杀菌强,不易引起耐药性等优点,成为抗菌药物新的研究热点^[3,4]。目前抗菌肽产量低,天然抗菌肽的分离难度较大,因而倾向于利用基因工程方法获得抗菌肽。

但利用基因工程方法表达抗菌肽也遇到一些难题:一是抗菌肽分子量太小,表达产物易降解,作为活性肽类,在纯化过程中极易丧失活性,即使获得了较高的表达量,纯化结果也不理想;二是为了纯化方便,目前的表达系统在载体上加入了一些标签(如 GST, S, MBP, Myc, Strep-tag II 等),方便了抗菌肽的纯化,但又因标签分子量太大而影响抗菌肽的活性,所以必须在纯化后去除标签,而标签的去除又是一个难题,所以纯化工作越来越成为抗菌肽生产

收稿日期: 2008-09-05

作者简介: 牛明福(1979-),女,河南南阳人,讲师,博士,主要从事病原分子生物学教学与研究工作。

的瓶颈。

考虑到抗菌肽需要保留天然的 N 端才能发挥活性,本研究在防御素基因(*sd*)的 C 末端加入了较短的 6× His-tag,以研究在短标签不去除的情况下对抗菌肽活性的影响,以期获得抗菌肽简单有效的表达、纯化方法。

1 材料和方法

1.1 质粒、受体菌、指示菌株

巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)受体菌 X-33,表达载体 pPICZαA 购自 Invitrogen 公司,试验菌株金黄色葡萄球菌和猪大肠杆菌为南京农业大学传染病实验室保存。

1.2 主要试剂

Ex-Taq 酶、限制性内切酶、连接酶等购自 Takara 公司;SDS-PAGE 低分子量 Marker 购自创

瑞生物公司;Tricine、Tris 购自 Sigma 公司,Zeocin 购自 Invitrogen 公司,其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 引物设计及合成

根据 GenBank 中 4kD Scorpion Defensin(Genbank 序列号 AAB27538)的成熟肽段的氨基酸序列^[5],选用酵母偏爱密码子,在其 N 端加上 α 信号肽 *Kex2* 酶裂解位点,以保证防御素具有天然 N 端。设计 4 条引物,通过 SOE(splicing by overlap extension)法获得防御素成熟肽段基因,引物序列见表 1。其中 P1,P2,P3 用于 *sd* 基因的扩增,P1,P2,P4 用于 Sd-His 基因的扩增,引物两端都分别引入了 *Xho*I 和 *Xba*I 酶切位点。

1.4 重组酵母表达载体的构建和抗菌肽的诱导表达

参考文献[6,7]构建Sd和Sd-His的重组酵母

表 1 基因引物序列

引物名称	引物序列 (5'-3')	引物长度(bp)
P1	cg actcg agaaaag aggtt tgg gttgtccattgaa tcaagg tgettg tcatagacattgtaga	63
P2	gaaaccag cacaataaccacctcttcttctaa taga tctacaatgtctatgacaagcacc	60
P3	gg ttattgttgetgg ttt tcaag caaac ttgtactgt ttatag aaa tcaa tgaaga tctgtc	60
P4	gg ttattgttgc tgg tttcttcaagcaaatgttadtgtttatag aaatcaacatcatcatcatcatcattgaagatctgtc	81

表达载体,并筛选阳性重组子进行诱导表达,表达上清进行抑菌活性测定,以初步检测抗菌肽是否表达。

1.5 表达产物的初步抑菌活性测定

抑菌活性测定采用标准琼脂孔穴扩散法,将金黄色葡萄球菌和大肠杆菌悬液(OD₆₀₀=1.0~1.2)15μL 与 LB 固体培养基 25 mL 混匀后铺平板,待其凝固后用无菌打孔器打孔,孔中加入 20μL 的 Sd 和 Sd-His 表达上清液,37℃培养过夜,第 2 天观察有无抑菌圈出现。

1.6 Sd 表达产物的纯化

经 48 h 诱导表达后,50 mL 表达产物经 12 000 r/min 离心 10 min,收集上清,用 0.22 μm 滤膜过滤;滤液在 0.1 mol/L 的醋酸钠(pH5.0)缓冲液中透析过夜,然后过 CM-Sepharose CL-6B 柱,CM-Sepharose CL-6B 柱提前用 0.1 mol/L 的醋酸钠缓冲液平衡。最后用 0.1~1.0 mol/L 的醋酸钠缓冲液梯度洗脱蛋白;纯化的蛋白用磷酸盐缓冲液(pH6.0)透析,并用 PEG8000 浓缩,Tricine-SDS-PAGE 检测纯化产物。

1.7 Sd-His 表达产物的纯化

Sd-His 表达产物按 QIAGEN 公司的 NTA-Ni 亲和层析柱说明书进行纯化,纯化的蛋白用磷酸盐缓冲液(pH6.0)透析,并用 PEG8000 浓缩,与 Sd 一起进行 Tricine-SDS-PAGE 分析。

1.8 纯化产物的 Tricine-SDS-PAGE

由于 Sd 只有 4 kD,试验采用了分离小肽的 Tricine-SDS-PAGE 电泳系统。取纯化后的 Sd 和 Sd-His 各 50 μL 与等量的上样缓冲液混合,沸水煮 10 min 后,取 20 μL 上样,同时取 10 μL 0.1 μg/μL 的分子量为 97.2~14.4 kD 的蛋白质标准样品作为对照。

1.9 纯化的 Sd 和 Sd-His 对金黄色葡萄球菌的抑菌活性测定

纯化后的 Sd 和 Sd-His 分别取 20 μL,按 1.5 的方法测定活性。

1.10 纯化的 Sd 和 Sd-His 的最低抑菌浓度(MIC)测定

取纯化的 Sd 和 Sd-His 原液,分别倍比稀释到 96 孔板各试验孔中,然后再加入 100 μL (10⁶ CFU/mL)金黄色葡萄球菌,设 2 个对照组:一组为 100 μL LB 培养液;另一组为 100 μL 菌液,37℃150 r/min 培养 12 h,用自动酶标仪测定 OD₆₀₀。每个稀释度设 3 个不同浓度的重复,与空白对照组比较,以含抗菌肽最高稀释培养孔中不生长细菌者(最小抑菌浓度 MIC)为判定标准。

1.11 Sd 及 Sd-His 的热稳定性比较

将抗菌肽 Sd 及 Sd-His 在沸水浴中加热不同的时间,检测其对金黄色葡萄球菌的抑菌活性变化,同时以无菌水和未煮沸的抗菌肽作对照,方法同 1.5。

在孔中分别加入 20 μ L 煮沸 5 min, 10min, 15 min, 20 min, 30 min, 1h 的 Sd 和 Sd-His, 进行抑菌试验。

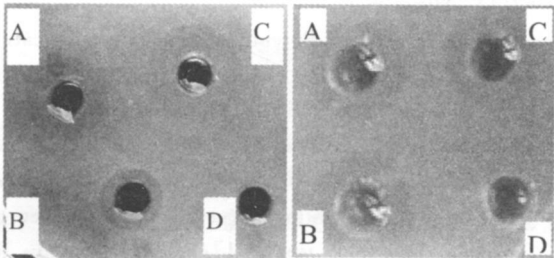
1.12 Sd 及 Sd-His 在不同 pH 值缓冲液中的稳定性比较

按照参考文献[7] 配制 pH 2 ~ 12 的 PBS 缓冲液。取 10 μ L 的 Sd 和 Sd-His, 分别加入 10 μ L 不同 pH 值缓冲液, 以不加抗菌肽的各不同 pH 值缓冲液为对照; 金黄色葡萄球菌为受试菌, 做抑菌试验, 方法同 1.5。第 2 天测量抑菌圈大小, 并绘制抑菌圈大小变化曲线。

2 结果与分析

2.1 Sd 和 Sd-His 的初步抑菌活性测定结果

抑菌活性测定结果见图 1。在铺有 *S. aureus* 和 *E. coli* 的琼脂平板上有明显的抑菌圈出现, 说明 Sd 和 Sd-His 获得了表达并有活性。

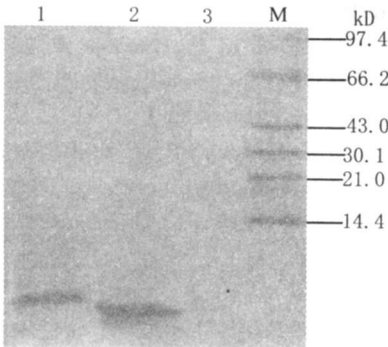


A. Sd-His; B. Sd; C. 氨苄青霉素对照;
D. 空载体对照(左: 金黄色葡萄球菌; 右: 大肠杆菌)

图 1 Sd 和 Sd-His 对金黄色葡萄球菌的初步抑菌活性测定

2.2 表达产物的纯化结果

纯化产物的 Tricine-SDS-PAGE 结果如图 2。从图 2 可以看出, Sd 和 Sd-His 均有效纯化。



1. Sd-His; 2. Sd; 3. 空白对照; M. 蛋白质 Marker

图 2 Sd 及 Sd-His 纯化后的 Tricine-SDS PAGE 电泳图谱

2.3 纯化后的 Sd 和 Sd-His 的活性测定

纯化后的 Sd 和 Sd-His 对 *S. aureus* 的抑菌圈见图 3。结果证明, 纯化后的 Sd 和 Sd-His 仍保持活性且比未表达时的抑菌圈大。

2.4 纯化的 Sd 和 Sd-His 的最低抑菌浓度(MIC)

以金黄色葡萄球菌为受试菌, 测定 2 种抗菌肽的最小抑菌浓度。测试结果分别为: Sd-His 为

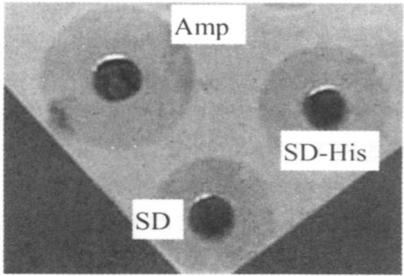


图 3 纯化的 Sd 和 Sd-His 对金黄色葡萄球菌的抑菌活性

4. 75 μ g/mL, Sd 为 5.0 μ g/mL。发现 Sd 的改造并未减小其抗菌活性, 反而稍有所增强。

2.5 Sd 和 Sd-His 的热稳定性检测结果

热稳定性试验显示, 在煮沸 20 min 时 Sd 和 Sd-His 抑菌圈大小与 Sd 未煮时没有差别; 但煮沸 20 min 后 Sd 的抑菌圈突然增大, 1h 后开始变小。而 Sd-His 则在煮沸 30min 以后抑菌圈逐渐变小(图 4)。说明两者在热稳定性上有差别, 但都能耐受至少 20 min 的高温。至于 Sd 加热后活性增强的原因, 有待进一步研究。

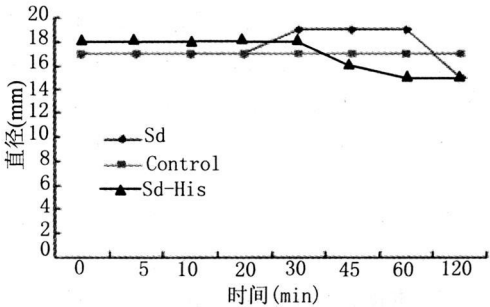


图 4 Sd 和 Sd-His 抗菌肽的热稳定性测定结果

2.6 Sd 和 Sd-His 在不同 pH 值缓冲液中抑菌活性的变化

Sd 和 Sd-His 在不同 pH 值时的抑菌活性见图 5。从图 5 可以看出, Sd-His 较 Sd 对碱的耐受力差, 在 pH 值上升至 8 以后抑菌活性急剧下降, 说明 6 \times His-tag 的加入可能影响了其对碱的耐受能力。

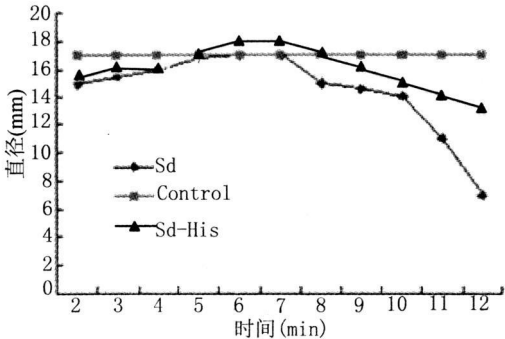


图 5 Sd 和 Sd-His 在不同 pH 值缓冲液中抑菌活性变化曲线

3 讨论

早期的抗菌肽多数是从生物体组织中提取纯化得到的。由于生物体内存在的抗菌肽含量低且纯化较困难,用基因工程技术构建高效表达系统生产抗菌肽已成为目前较多的选择。大肠杆菌表达系统是一种表达量高且简单易纯化的系统,但运用该系统表达抗菌肽却遇到很多困难:一是抗菌肽的宿主细胞毒性。宿主细胞表达的抗菌肽会反馈性地抑制大肠杆菌等宿主细胞的增殖,从而影响抗菌肽的进一步表达;二是容易被降解。抗菌肽本身带有大量正电荷,对蛋白酶非常敏感,在表达细胞中容易被降解,难以实现大量表达。以上原因使抗菌肽在大肠杆菌表达系统的表达中受到了限制^[8]。

酵母表达系统含有 *Kex2* 酶裂解位点,该酶是酵母自身编码的一种前体加工酶,是一个 Ca^{2+} 依赖性的丝氨酸蛋白酶,负责大多数酵母蛋白的分泌与成熟^[9]。选用酵母表达系统进行抗菌肽的分泌表达,可以保留抗菌肽发挥活性的天然 N 端。但酵母表达载体上所带的 6× His 标签在 C-myc 肽段后, C-myc 肽段由 10 个氨基酸残基构成,加上中间的 5 个氨基酸和 6× His 标签,使得抗菌肽在表达后就带有 21 个氨基酸的尾巴,而抗菌肽本身分子量就比较小,只有 30 个氨基酸左右,尾巴过长可能会影响抗菌肽的结构,进而影响其活性。本研究在目的基因的 C 末端加入了 6× His 标签和表达终止信号 TGA,使得表达的抗菌肽仅带有 6× His 标签,大大减小了抗菌肽的尾巴长度,而且还可以利用商品化的镍柱进行纯化,这对增强抗菌肽表达产物的活性起到了很好的作用。

抗菌活性测定结果显示,6× His 标签并未降低防御素的活性,反而有稍微的增强作用,这可能与抗菌肽的抗菌机理有关。大部分抗菌肽富含碱性氨基酸,而碱性氨基酸是抗菌肽与细菌脂膜相互作用的关键因素;组氨酸属于碱性氨基酸,6× His 标签的加入是否增强了抗菌肽与细菌脂膜的相互作用,有待进一步研究。

热酸稳定性是抗菌肽临床应用的一个重要指标,试验在防御素纯化后进行了热酸稳定性测定。发现 6× His-tag 的加入对防御素的热酸稳定性有影响, Sd 在加热过程中活性突然增强,进而又减弱,这是否与 6× His-tag 的加入影响到了其结构的变化有关,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Lamberty M, Zachary D, Lanot R, *et al.* Constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and linear antibacterial peptide in a termite insect[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(6): 4085—4092.
- [2] Jones R N, Pfaller M A. Bacterial resistance: a worldwide problem[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1998, 31(2): 379—388.
- [3] Andress R, Koczulla R. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential[J]. *Drugs*, 2003, 63(4): 389—406.
- [4] Jacob L, Zasloff M. Potential therapeutic applications of magainins and other antimicrobial agents of animal origin[J]. *Ciba Found Symp*, 1994, 186: 197—216.
- [5] Stephane C, Max G, Francois B, *et al.* Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4kDa antibacterial peptide presenting structural with insect defensins and scorpion toxins[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 194(1): 17—22.
- [6] Mingfu Niu, Xiang Li, Jianchao Wei, *et al.* The molecular design of a recombinant antimicrobial peptide CP and its *in vitro* activity[J]. *Protein Expression and Purification*, 2008, 57(1): 95—100.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.
- [8] Piers K L, Brown M H, Hancock R W. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria[J]. *Gene*, 1993, 134: 7—13.
- [9] Bathurst I C, Brennan S O, Carrell R W, *et al.* Yeast KEX2 protease has the properties of a human proalbumin converting enzyme[J]. *Science*, 1987, 235(4786): 348—350.