

牛乳铁蛋白活性多肽 LfcinB 在大肠杆菌中的串联表达、纯化及生物活性分析

刘珂杭¹, 宗西翠², 张慧丹¹, 完颜杨珂¹, 陈玉清¹

(1. 南京师范大学生命科学学院, 生物化学与生物制品研究所, 江苏 南京 210023)

(2. 南京中医药大学翰林学院, 医学院西医基础教研室, 江苏 泰州 225300)

[摘要] 牛乳铁蛋白(LfcinB)是一种阳离子抗菌肽,具有抗细菌、抗肿瘤等多种生物学活性. 本文探讨了利用 SUMO(Small Ubiquitin-Related Modifier)融合标签在大肠杆菌系统中通过 LfcinB 串联表达策略制备重组 LfcinB 的方法. 结果显示,大于 90%的 SUMO-(LfcinB)_n 蛋白以可溶形式表达于 BL21(DE3)细胞中;SUMO-(LfcinB)₂ 的表达量高于 SUMO-LfcinB 和 SUMO-(LfcinB)₃. 通过 SUMO 特异性蛋白酶切除 SUMO 标签,羟胺释放单体,得到纯化的重组 LfcinB,产率约为 15 mg/L. 生物活性结果表明,重组 LfcinB 具有一定的抗菌和抗肿瘤活性. 本研究为结合 SUMO 标签与串联表达策略大量制备获得具有生物学功能的重组抗菌肽提供了一种有效的方法.

[关键词] Bovine lactoferricin, 抗菌肽, 串联表达, SUMO

[中图分类号] Q291 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2020)02-0100-08

Tandem Expression, Purification and Bioactivity Characterization of Bovine Lactoferricin Peptide in *Escherichia coli*

Liu Kehang¹, Zong Xicui², Zhang Huidan¹, Wanyan Yangke¹, Chen Yuqing¹

(1. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Institute of Biochemistry and Biological Products, Nanjing 210023, China)

(2. Department of Basic Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine Hanlin College, Taizhou 225300, China)

Abstract: Bovine lactoferricin(LfcinB) is a cationic antimicrobial peptides with activities of anti-bacteria and anti-tumor. Here it was reported that a method of producing tandem multimers of LfcinB using SUMO(small ubiquitin-related modifier) tag in *Escherichia coli*. Results showed that the expression level of the soluble fusion protein with SUMO tag was more than 90% of total target protein, and the dimer of LfcinB was expressed at a higher level than monomer and trimer when fused with SUMO tag. After using SUMO-specific protease to remove the SUMO tag, hydroxylamine to release monomer, the purified LfcinB was obtained with a yield of approximately 15 mg/L. The biological assays demonstrated that the recombinant LfcinB exhibited a certain antimicrobial and antitumor activity. Altogether, the SUMO fusion system with tandem repeat expression technology provides a potential production method for functional antimicrobial peptides.

Key words: Bovine lactoferricin, antimicrobial peptide, tandem expression, SUMO

抗菌肽是广泛存在于生物界的先天免疫小肽,具有抗细菌、抗真菌、抗病毒、抗炎、抗肿瘤和免疫调节等多种生物学功能^[1-3]. Bovine lactoferricin(LfcinB)是一种阳离子抗菌肽,它是牛乳中的乳铁蛋白在酸性条件下经胃蛋白酶水解后,从 N 端释放的由 25 个氨基酸残基组成的生物活性多肽^[4]. LfcinB 的氨基酸序列为 FKRRWQWRMKKLGAPSTCVRRF,结构中的 2 个半胱氨酸通过形成分子内二硫键使 LfcinB 呈现不完全的桶状结构. 研究发现二硫键在 LfcinB 生物活性中的作用不大,被破坏后抗菌活性并不减弱^[5].

LfcinB 具有多种生物学功能. 不同细菌对 LfcinB 的敏感性有所不同;LfcinB 浓度在 0.1 μg/mL 时,对敏感细菌的生长就有明显的抑制作用^[4]. LfcinB 和某些抗生素之间存在协同作用,盐酸二甲胺四环素和 LfcinB 联合使用能够显著提高对抗生素敏感的耐药金黄色葡萄球菌的抑菌作用^[6]. 另外, Yan 等发现

收稿日期:2020-01-12.

基金项目:国家自然科学基金项目(81573337)、江苏省自然科学基金项目(BK20141446).

通讯作者:陈玉清,博士,教授,研究方向:抗菌免疫肽抗癌的分子机制. E-mail:chenyuqing@njnu.edu.cn

LfcinB 对人类关节软骨和滑膜产生有效的抗分解代谢和抗炎作用^[7]. Mader 等研究发现 LfcinB 对人类白血病细胞有细胞毒性,但对正常人类淋巴细胞、成纤维细胞或内皮细胞没有任何不良影响, LfcinB 可以通过诱导活性氧的产生诱导线粒体依赖的凋亡途径杀死癌细胞^[8].

抗菌肽分子量小、分子中含有碱性氨基酸使得对一些蛋白酶敏感,并且也存在表达产物对宿主细胞的潜在毒性. 因此,为避免抗菌肽对宿主细胞的潜在毒性,降低蛋白酶的水解作用以及方便纯化和制备,通常采用大肠杆菌融合表达系统^[9]. 目前已报道多种可成功用于抗菌肽的原核表达和纯化的融合标签,包括 GST、MBP、DAMP21、Trx 等^[10]. 泛素化相关小分子蛋白(SUMO)标签是一种已被用于大肠杆菌融合表达系统,与 SUMO 融合可以增强目的蛋白的可溶性表达,切割 SUMO 标签的 SUMO 蛋白酶也具有高度的特异性和高效的切割效率,并且当目标蛋白直接融合到 SUMO 的 C 端时, SUMO 蛋白酶裂解后不会在目标蛋白的 N 端留下多余的氨基酸残基^[11]. 鉴于 SUMO 标签的促进融合蛋白的可溶性表达、保护融合蛋白免受蛋白酶水解的作用、标签容易切除的优点,近年来广泛应用于多种蛋白质的融合表达. 抗菌肽分子量小,融合表达时通常产量很低,多基因串联表达被认为是提高小分子肽表达产量的有效方法^[12]. 因此,本研究首次尝试以 SUMO 作为 LfcinB 融合标签,采取 *LfcinB* 基因串联表达的策略,以期获得较高得率且有生物学活性的 LfcinB,为发展更有效的重组抗菌肽制备技术提供实验依据.

1 材料方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与试剂

大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)、DH5 α 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 购自中国菌种保藏中心;大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株 PC12 由本实验室保藏. 表达载体 pSUMO 为本实验室保存; *Hind* III、*Xba* I、*Bam*HI、*Bgl* II 以及 Taq 酶和 DNA Marker、蛋白质 Marker、T4 DNA Ligase 均购自 TaKaRa 生物公司;DNA 胶纯化试剂盒、质粒小提试剂盒购自诺唯赞公司; Ni²⁺ chelating Sepharose Fast Flow 购自 Pharmacia Biotech 公司;鼠抗 anti-6 \times His 一抗,山羊抗鼠 IgG (FITC) 购自日本 Wako 公司; IPTG 购自 Promega 公司. Annexin V-FITC/PI 购自南京凯基生物公司.

1.2 方法

1.2.1 表达载体 pSUMO-(LfcinB)_n 的构建

根据抗菌肽 LfcinB 的核苷酸序列和载体 pSUMO 多克隆位点,设计合成 pSUMO-F 和 pSUMO-R 两条引物. 两引物中除了引入克隆位点 (*Bam*HI 和 *Hind* III) 以外还引入了 *Bam*HI 的同尾酶 *Bgl* II 以及羟氨的识别序列等位点. 引物序列如下 (红色字体表示 *Bam*HI 酶切位点,蓝色字体表示 *Hind* III 酶切位点,黄色字体表示 *Bgl* II 酶切位点,划线部分为羟氨切割位点):

pSUMO-F: 5' CGGATCC AACGGC TTAAATGCCGCCGCTGGCAGTGGC 3',

pSUMO-R: 5' CCAAGCTTAGATCTGCCGTTGCCACTGCCAGCGCGGCATTATAA 3'.

以实验室构建的载体 pET32a-LfcinB 为模板合成含有 LfcinB 的核苷酸序列, *Bam*HI 和 *Hind* III 双酶切 pSUMO 质粒和 LfcinB 基因的 PCR 产物,经 T4 DNA ligase 连接后转化至 *E. coli* DH5 α . 转化液涂布到氨苄抗性的 LB 平板上, 37 °C 倒置培养,待长出单菌落. 提取单菌落中的质粒进行测序,获得正确的重组质粒 pSUMO-LfcinB.

1.2.2 表达载体 pSUMO-(LfcinB)₂ 和表达载体 pSUMO-(LfcinB)₃ 的构建

用 *Bam*HI 和 *Xba*I 以及 *Bgl* II 和 *Xba*I 分别双酶切质粒 pSUMO-LfcinB,纯化后回收酶切片段, 16 °C 下用 T4 DNA Ligase 连接上述双酶切的载体和片段,连接液转化至 *E. coli* DH5 α ,涂布于含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上, 37 °C, 12 h~16 h 进行倒置培养待其长出单菌落. 提取单菌落的质粒,获得 pSUMO-(LfcinB)₂ 并测序鉴定. 进一步将得到的 pSUMO-(LfcinB)₂ 用 *Bam*HI 和 *Xba*I 以及 *Bgl* II 和 *Xba*I 分别双酶切,回收双酶切产物后经 T4 DNA Ligase 连接过夜,转化至 *E. coli* DH5 α . 涂布固体 LB 平板上 (50 μ g/mL 卡那霉素) 于 37 °C 倒置培养 12 h~16 h,挑选阳性克隆提取质粒,获得 pSUMO-(LfcinB)₃,测序鉴定.

1.2.3 表达宿主菌的构建

将以上序列鉴定正确的 pSUMO-LfcinB、pSUMO-(LfcinB)₂、pSUMO-(LfcinB)₃ 质粒分别转化至宿主菌

E. coli BL21(DE3), 涂布固体 LB 平板上(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 12 h~16 h, 挑选单个克隆培养, 提取质粒进行测序鉴定, 获得重组表达菌 *E. coli* BL21-pSUMO-(*LfcinB*)₁、*E. coli* BL21-pSUMO-(*LfcinB*)₂ 和 *E. coli* BL21-pSUMO-(*LfcinB*)₃。

1.2.4 SUMO-(*LfcinB*)_n 重组蛋白的诱导表达与纯化

37 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm 摇床培养 *E. coli* BL21-pSUMO-(*LfcinB*)₁、*E. coli* BL21-pSUMO-(*LfcinB*)₂ 和 *E. coli* BL21-pSUMO-(*LfcinB*)₃ 至 OD_{600} 达到 0.6 左右时, 加入 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L) 诱导, 22 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h 后, 10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。细胞重悬于裂解缓冲液(20 mmol/L Tris 缓冲液、0.5 M NaCl, pH 8.0) 进行超声波破碎, 12 000 r/min 离心 20 min 收集裂解上清液。将上清液上样于 Ni^{2+} -IDA-Sepharose CL-6B 亲和层析柱, 用含咪唑的洗脱缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl、1 M 咪唑、0.5 M NaCl, pH 8.0) 进行洗脱。收集 OD_{280} 洗脱峰对应洗脱蛋白, 用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液透析后得 SUMO-(*LfcinB*)_n, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

重组蛋白质量的计算方法: 使用考马斯亮蓝试剂盒测定各个拷贝菌株中上清蛋白的浓度, 并利用 BandsScan 5.0 软件对凝胶图片中的电泳条带进行光密度分析, 计算重组蛋白质量。

1.2.5 *LfcinB* 的纯化

每 50 μg SUMO-(*LfcinB*)_n 融合蛋白加入 1 U SUMO 酶, 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。再用 1M 羟氨切割 2 h, 切割产物用 PBS 缓冲液透析去除羟氨, 再通过 Ni^{2+} -IDA-Sepharose CL-6B 层析分离纯化, 收集穿透峰对应流出液, 用 PBS 缓冲液进行透析。最后将样品上样于半制备分离柱 Bechman C18, 在 Agilent HPLC 1100 层析仪上进行反相分离, 用含 0.1% 的三氟乙酸的 15%~75% 乙腈进行梯度洗脱, 收集洗脱峰样品, 透析后冷冻干燥保存。保存的冻干样品取少量溶解测浓度, 并计算回收率。

重组蛋白纯化回收率(%) = 回收重组蛋白的质量/切割融合蛋白质量 $\times 100\%$ 。

1.2.6 Tricine-SDS-PAGE 电泳

冻干样品溶于无菌水后考马斯亮蓝试剂盒测定浓度, 然后取样品进行 Tricine-SDS-PAGE, 浓缩胶浓度 4%, 夹层胶浓度 10%, 分离胶浓度 16.5%, 按常规方法进行。

1.2.7 抗细菌活性的测定

采用琼脂糖孔穴扩散法测定重组 *LfcinB* 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 的抗菌活性。对数生长期细菌按 1% 加入琼脂糖 LB 培养, 凝固后用灭菌枪头打孔, 在孔中加入待测样品液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养过夜, 观察抑菌活性。

1.2.8 抗肿瘤毒性检测

$1 \times 10^6/\text{mL}$ 鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞 1 mL 培养于 6 孔板, 分别用不同浓度重组 *LfcinB* 肽孵育 16 h; 收集细胞加入凋亡检测染色液 Annexin V-FITC 和 PI, 室温避光反应 15 min, 分别进行荧光显微镜观察和流式细胞仪检测, 激发波长 $E_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; 发射波长 $E_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ 。

1.2.9 统计分析

使用 Origin 8 软件进行统计, 获得至少 3 次独立实验的所有数据并表示为(平均值 \pm 标准偏差)(S.D.)。使用单因素方差分析(ANOVA)分析数据以确定不同组之间的显著差异。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 pSUMO-(*LfcinB*)_n 表达质粒的构建

为提高抗菌肽的表达产量, 通常采用串联多聚体形式来代替单体形式进行抗菌肽的融合表达^[9,13]。pSUMO 是本实验室前期构建的一个带有 SUMO 标签的原核表达质粒, 具有 *Bam*H I、*Xba* I、*Bgl* II 等多克隆酶切位点。将扩增得到的 *LfcinB* 基因片段和 pSUMO 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后连接获得 pSUMO-*LfcinB*。将得到的质粒 pSUMO-*LfcinB* 利用同尾酶技术, 对 pSUMO-*LfcinB* 分别用 *Bam*H I 和 *Xba* I 以及 *Bgl* II 和 *Xba* I 两个双酶切体系进行切割, 然后对两个体系分别回收大、小片段, 用 T4 DNA Ligase 连接大小片段后即可得到双拷贝表达载体 pSUMO-(*LfcinB*)₂。用同尾酶技术进一步对 pSUMO-(*LfcinB*)₂ 进行切割和连接, 得到 3 个串联拷贝数的重组质粒 pSUMO-(*LfcinB*)₃。构建的大体流程如图 1 所示。同尾酶是指具切割不同的 DNA 片段但产生相同的粘性末端的一类限制性内切酶, 利用同尾酶技术可以构建多拷贝串

联基因重组质粒^[14]. 本研究中利用同尾酶 *Bam*H I 和 *Bgl* II 酶切连接后形成新序列 GGATCT, 并结合非同尾酶 *Xho* I 使得 *LfcinB* 基因片段能够定向连续插入载体, 成功构建出 $\text{pSUMO}-(\text{LfcinB})_n$ ($n=2,3$), 经测定序列构建正确.

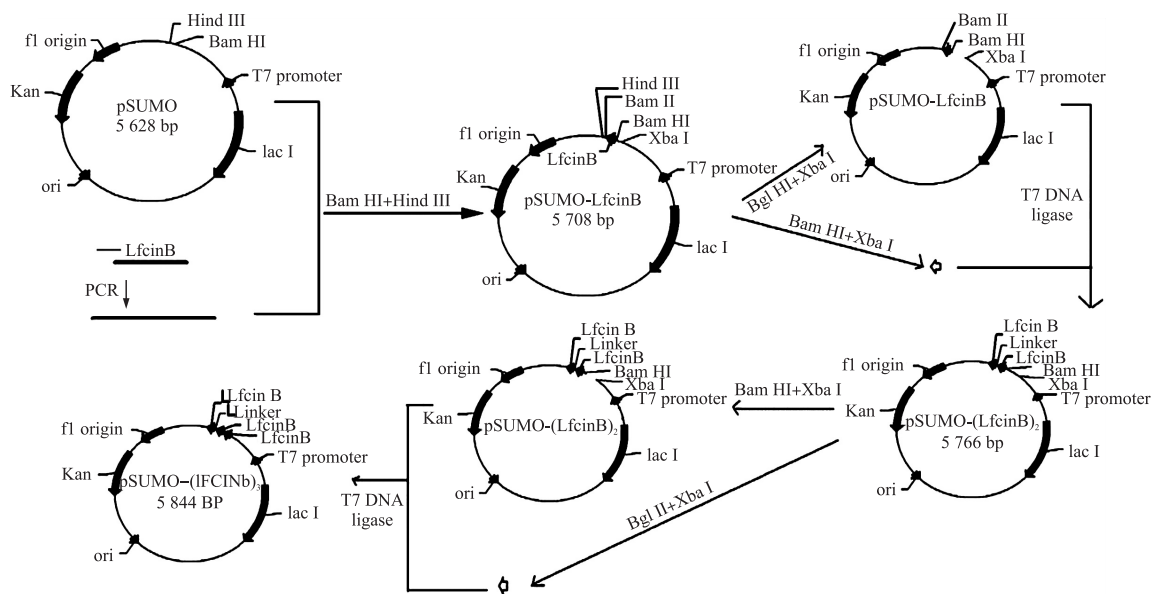
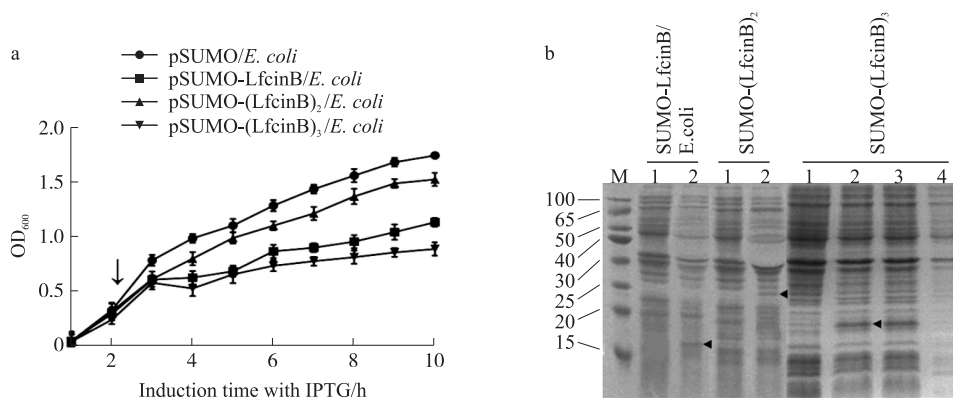


图1 $\text{pSUMO}-(\text{LfcinB})_n$ 表达质粒的构建

Fig. 1 Construction of $\text{pSUMO}-(\text{LfcinB})_n$

2.2 SUMO-(LfcinB)_n 重组蛋白的表达

$\text{pSUMO}-(\text{LfcinB})_n$ 转化至宿主大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 细胞, 得到重组菌株 *E. coli* BL21/ $\text{pSUMO}-(\text{LfcinB})_n$ ($n=1,2,3$). 重组菌株加入 IPTG 诱导不同时间, 测定 SUMO-(LfcinB)_n 表达产物对宿主细胞的毒性, 结果如图 2a 所示. 各重组菌株的生长速度比较如下: *E. coli*/ $\text{pSUMO}-(\text{LfcinB})_3$ < *E. coli*/ $\text{pSUMO}-(\text{LfcinB})_1$ < *E. coli*/ $\text{pSUMO}-(\text{LfcinB})_2$ < *E. coli*/ pSUMO . 可见, SUMO-(LfcinB)_n 的表达对宿主菌 *E. coli* BL21 的生长有一定抑制作用. 其中 SUMO-(LfcinB)₁ 和 SUMO-(LfcinB)₃ 的表达对 *E. coli* BL21 生长的抑制作用相对较强, SUMO-(LfcinB)₂ 的表达对 *E. coli* BL21 生长的抑制作用最弱, 即宿主细胞毒性最低. 22 ℃, IPTG 诱导 16 h 后, 收集蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 2b 所示. SDS-PAGE 分别检测到约 16 kDa、20 kDa 和 24 kDa 蛋白的诱导表达, 与 SUMO-LfcinB, SUMO-(LfcinB)₂ 和 SUMO-(LfcinB)₃ 的分子量基本一致. 由于 *E. coli*/ $\text{pSUMO}-(\text{LfcinB})_2$ 的宿主细胞毒性最低, 因此选取 *E. coli*/ $\text{pSUMO}-(\text{LfcinB})_2$ 进行可溶



a: $\text{pSUMO}-(\text{LfcinB})_n/\text{E. coli}$ 生长曲线; b: SDS-PAGE 融合蛋白表达. M: 蛋白分子 Marker; 1: 未诱导 $\text{pSUMO}-(\text{LfcinB})_n/\text{E. coli}$ 总蛋白; 2: IPTG 诱导的 $\text{pSUMO}-(\text{LfcinB})_n/\text{E. coli}$ 总蛋白; 3: IPTG 诱导的 $\text{pSUMO}-(\text{LfcinB})_2/\text{E. coli}$ 上清液; 4: IPTG 诱导的 $\text{pSUMO}-(\text{LfcinB})_2/\text{E. coli}$ 沉淀.

图2 重组表达菌生长曲线及重组蛋白表达分析

Fig. 2 Growth curve of recombinant *E. coli* and analysis of recombinant protein expression

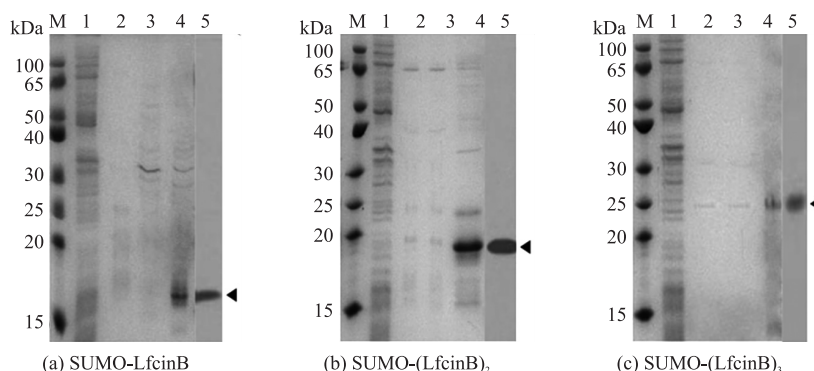
性分析. 结果表明,90%的 SUMO-(LfcinB)₂ 融合蛋白存在于超声上清液中,仅 10%以包涵体形式表达.

由于抗菌肽自身的抗菌性,通常采用融合表达策略以降低潜在的宿主细胞毒性. 然而,并非所有的融合标签都能有效避免宿主细胞毒性,例如 GST 标签并不能有效避免宿主细胞毒性^[15]. 本研究发现 SUMO 标签融合能在一定程度上避免 (LfcinB)_n 宿主细胞毒性,并且影响的程度与串联拷贝数有关. SUMO-(LfcinB)₃ 表达的宿主细胞毒性最大,SUMO-(LfcinB)₂ 表达的宿主毒性最低,推测原因可能在于不同拷贝数串联 (LfcinB)_n 与 SUMO 在空间上的相互影响不同,SUMO 能较好屏蔽 (LfcinB)₂,因此仅产生较弱的宿主细胞毒性. SUMO 标签已广泛用于抗菌肽的 *E. coli* 表达而避免了宿主细胞毒性,例如 Cecropin A-LL37 和 Plectasin 等抗菌肽^[16-17]. 有研究认为,SUMO 标签能通过周围亲水和中心疏水核心结构显著提高融合抗菌肽的可溶性表达^[18]. SUMO 标签能有效帮助蛋白质折叠,显著提高包括抗菌肽在内的多种蛋白的可溶性表达^[19-20]. 本研究也发现,即使是 2 个 LfcinB 的串联抗菌肽,SUMO 标签也能实现 90%的可溶性表达.

2.3 SUMO-(LfcinB)_n 和 LfcinB 的蛋白纯化

E. coli/pSUMO-(LfcinB)_n 经 IPTG 诱导表达重组蛋白,将超声波破碎细胞的细胞上清液进行 Ni²⁺-NTA 亲和层析,收集蛋白质峰对应样品,SDS-PAGE 电泳分析如图 3 所示. 在 SUMO-(LfcinB)_n 对应分子量处均有一条明显而单一的条带. 因为 SUMO 的 N 端有 6×His-tag,经 His 抗体的 Western blotting 分析进一步证实纯化产物为 SUMO-(LfcinB)_n 融合蛋白. 在 1 L 的培养体系中,纯化得到的 SUMO-LfcinB、SUMO-(LfcinB)₂ 和 SUMO-(LfcinB)₃ 的产量分别为 69.1 mg、150 mg 和 57 mg. 用 SUMO 标签融合表达设计时通常在 SUMO 的 N 端添加 (His)6-tag,以便于亲和纯化和检测^[21-22]. 本研究用 (His)6-tag 高效纯化出 SUMO-(LfcinB)_n,以用于后续进一步的切割与纯化. 尽管多聚体串联表达时随着肽与载体的质量比的增加,可能提高肽的产量和稳定性. 本研究却发现,2 个 LfcinB 串联表达得到的产量高于单拷贝 LfcinB 和 3 拷贝 LfcinB 串联表达的产量,可见 SUMO 融合蛋白的表达量与串联拷贝数间并无线性正相关. 有报道通过重叠延伸 PCR(SOE-PCR)将蟹 MT 基因的 2 个和 3 个拷贝的串联重复序列整合在一起,采用 SUMO 融合表达系统在大肠杆菌中表达,增加了重组 MT 蛋白的稳定性和溶解性,并且显著增强了 Cu,Cd 或 Zn 的耐受性和生物积累^[23]. 因此,串联表达是提高产量的有效方式. 然而,对于不同的分子,串联数并非越多越好,最佳串联数取决于融合标签和串联肽的相互影响.

经亲和层析纯化得到的 SUMO-(LfcinB)_n 融合蛋白用 SUMO 酶在 30 ℃ 酶切 30 min,以释放抗菌肽 (LfcinB)_n. Tricine-SDS-PAGE 测定 SUMO 酶的酶切作用,结果如图 4 所示. 可见 SUMO 酶能高效切割 SUMO-(LfcinB)_n 融合蛋白,释放 (LfcinB)_n. 将 SUMO-(LfcinB)₂ 的 SUMO 酶切反应体系用 Ni²⁺-NTA 进行第二次亲和纯化,收集不能被 Ni²⁺-NTA 吸附的穿透峰样品,再用羟氨切割释放 LfcinB,透析处理去除羟胺等小分子成分得到纯化的样品,经电泳检测为分子量约 3.4 kDa 的重组 LfcinB,且在 1 L 的培养基中能得到约 15 mg 的重组 LfcinB. SUMO 酶是一种识别 SUMO 空间结构并切除 SUMO 的特异性酶,无需添加任何



a:SUMO-(LfcinB)蛋白纯化后 western blot 验证;b:SUMO-(LfcinB)₂ 蛋白纯化后 western blot 验证;c:SUMO-(LfcinB)₃ 蛋白纯化后 western blot 验证. M:蛋白分子 Marker,1:pSUMO-(LfcinB)_n/*E. coli* 的未诱导菌液,2:融合蛋白经 Ni-NTA 亲和层析之后的流出液,3:100 mmol/L 咪唑洗脱液,4:经亲和层析纯化获得的 SUMO-LfcinB 蛋白,5:免疫沉淀鉴定 SUMO-(LfcinB)_n 蛋白. 箭头指向融合蛋白.

图 3 SUMO-(LfcinB)_n 蛋白纯化与鉴定的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Purification and identification of SUMO-(LfcinB)_n protein by SDS-PAGE

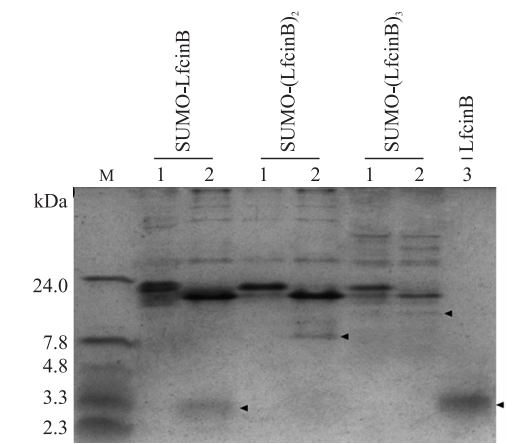
酶切位点,因此切割产物中无额外的氨基酸序列^[24]. SUMO 酶独特的切割方式对表达小分子多肽非常有利,因为额外的氨基酸序列对小肽的功能影响可能比大分子蛋白更为显著.大量的研究显示,SUMO 酶切割释放的抗菌肽具有很好的生物学活性^[9],进一步显示 SUMO 融合表达系统在抗菌肽基因工程领域的优势.

2.4 检测重组 LfcinB 的抗菌活性

已有研究表明,天然 LfcinB 对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 具有抗菌作用^[4]. 本研究对纯化得到的重组 LfcinB 进行抗 *Staphylococcus aureus* 活性鉴定,结果如图 5 所示. 琼脂糖孔穴扩散法检测结果显示,15 $\mu\text{mol/L}$ 的重组 LfcinB 处理观察到抑菌圈,25 $\mu\text{mol/L}$ 重组 LfcinB 处理的抑菌圈更为明显,表明重组 LfcinB 具有对 *Staphylococcus aureus* 的抗菌活性. 已有多个研究报道,SUMO 标签可溶性表达获得的重组抗菌肽具有较好的抗菌活性^[22,25]. 本研究采用 SUMO 融合 2 个拷贝的 LfcinB 串联表达,经 SUMO 酶和羟胺切割后得到了具有抗菌活性的重组 LfcinB,表明 SUMO 融合与串联表达相结合的策略,可以得到具有生物学活性的重组抗菌肽.

2.5 重组 LfcinB 对肿瘤细胞 PC12 作用的分析

天然 LfcinB 对多种恶性肿瘤细胞具有抗癌活性^[26]. 本研究选用大鼠 PC12 嗜铬细胞瘤细胞,评价重组 LfcinB 对 PC12 细胞的杀伤活性. 不同浓度的重组 LfcinB 对肿瘤细胞 PC12 处理 12 h 后分别进行形态学观察和流式细胞分析,结果如图 6 所示. PBS 对照组的 PC12 细胞形态完好,25 $\mu\text{mol/L}$ 重组 LfcinB 处理 12 h 的 PC12 细胞形态模糊;而当浓度提高到 50 $\mu\text{mol/L}$,PC12 发生碎片



M:超低分子量蛋白 Marker,1:SUMO-(LfcinB)_n 纯化蛋白,2:SUMO 酶切产物,3:SUMO 酶切产物经 Ni²⁺-NTA 纯化的重组 LfcinB.

图 4 SUMO 酶切与纯化产物的 Tricine-SDS-PAGE 鉴定
Fig. 4 SUMO digestion and Tricine-SDS-PAGE identification of purified product

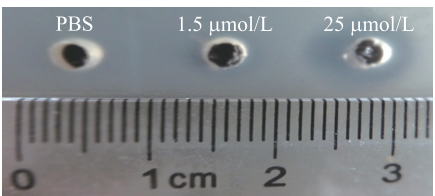
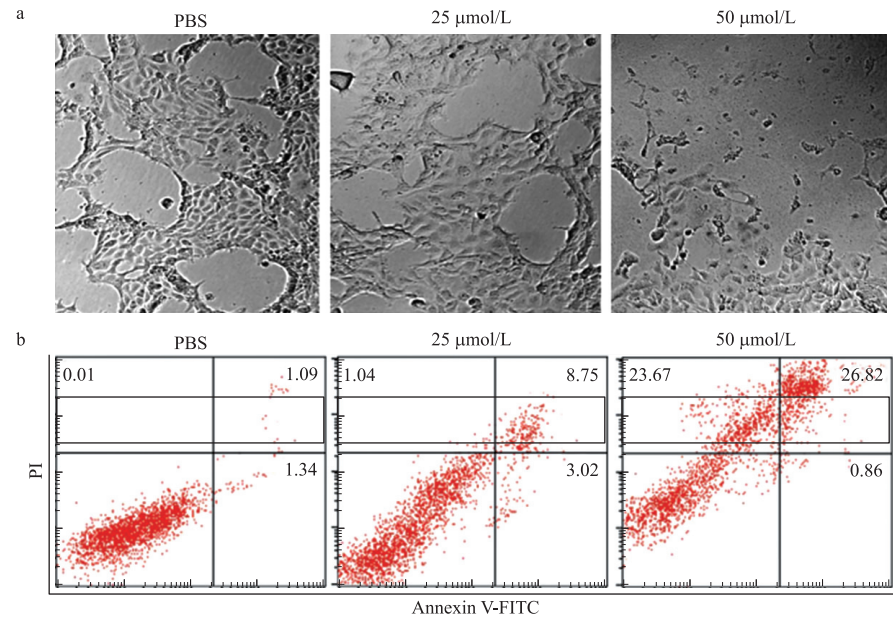


图 5 重组 LfcinB 对金黄色葡萄球菌的抗菌检测
Fig. 5 Detection of antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* of recombinant LfcinB



a:不同浓度重组 LfcinB 孵育 PC12 细胞 12 h 后的形态学观察实验;b:不同浓度重组 LfcinB 处理肿瘤细胞 PC12 12 h 后的流式细胞术分析.

图 6 重组 LfcinB 对 PC12 细胞的杀伤活性检测

Fig. 6 Detection of the cytotoxicity against PC12 tumor cells induced by recombinant LfcinB

化,表明大部分细胞死亡. Annexin V/PI 染色结合流式细胞术进一步揭示重组 LfcinB 对肿瘤细胞 PC12 的杀伤作用. 25 $\mu\text{mol/L}$ 重组 LfcinB 诱导 11.77 % 的 PC12 细胞凋亡, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的重组 LfcinB 可以诱导 27.68 % 的 PC12 细胞凋亡和 23.67 % 的 PC12 细胞坏死. 可见重组 LfcinB 对 PC12 细胞具有杀伤活性,能够诱导 PC12 细胞凋亡,高浓度的重组 LfcinB 还可以诱导 PC12 细胞坏死. 近年来越来越多的研究揭示 LfcinB 可以通过多种机制发挥对多种恶性肿瘤细胞的抗癌作用, LfcinB 可以靶向 V-H^+ -ATPase 选择性地杀伤高转移性乳腺癌细胞和高转移性前列腺癌细胞^[27-28]; LfcinB 可以通过提高抑癌基因的表达、诱导凋亡、抑制血管生成等多种途径发挥对结直肠癌的选择性抗癌作用^[29]. LfcinB 对多种恶性肿瘤的选择性杀伤作用显示出其在抗癌领域的潜在应用价值. 本研究利用大肠杆菌表达系统获得具有抗癌活性的重组 LfcinB,将推动 LfcinB 在抗癌领域的应用.

3 结论

本研究首次将 SUMO 标签融合和串联表达相结合,利用同尾酶技术成功构建出重组质粒 pSUMO-(LfcinB)_n ($n=1,2,3$). 通过在 LfcinB 串联序列间设计羧基切割位点,利用 SUMO 酶和羧基成功从 SUMO-(LfcinB)_n 融合蛋白释放出重组 LfcinB 单体. 研究认为 SUMO 标签能显著促进 SUMO-(LfcinB)_n 的可溶性表达,并能在一定程度上避免 (LfcinB)_n 的宿主细胞毒性,其中 2 个拷贝基因串联的宿主细胞毒性最低,产量最高. 获得的重组 LfcinB 对金黄色葡萄球菌表现出一定的抑菌作用,对大鼠 PC12 嗜铬细胞瘤细胞具有促凋亡和坏死效应. 2 个拷贝的基因串联对采用 pSUMO-(LfcinB)_n 系统原核表达 LfcinB 优于单拷贝和 3 拷贝串联. 多拷贝表达策略能在一定程度上提高目的蛋白的表达量,但不是绝对的,即表达量和拷贝数不成正比,其具体原因和机理有待于进一步探讨和研究. 本研究首次将 SUMO 融合与串联表达策略用于抗菌肽 LfcinB 的大肠杆菌基因工程,为生产具有抗菌和抗癌活性的抗菌肽应用于临床提供了有效的方法.

[参考文献]

- [1] AHMED A, SIMAN-TOV G, HALL G, et al. Human antimicrobial peptides as therapeutics for viral infections[J]. Viruses, 2019, 11(8): 704.
- [2] OSHIRO K, RODRIGUES G, MONES B, et al. Bioactive peptides against fungal biofilms[J]. Frontiers in microbiology, 2019, 10: 2169.
- [3] SIERRA J M, FUSTÉ E, RABANAL F, et al. An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development[J]. Expert opinion on biological therapy, 2017, 17(6): 663-676.
- [4] BELLAMY W, TAKASE M, WAKABAYASHI H, et al. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin[J]. Journal of applied bacteriology, 1993, 73(6): 472-479.
- [5] HWANG P M, ZHOU N, SHAN X, et al. Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin[J]. Biochemistry, 1998, 37(12): 4288-4298.
- [6] SHI Y, KONG W, NAKAYAMA K. Human lactoferrin binds and removes the hemoglobin receptor protein of the period onto pathogen or phyromonas gingivalis[J]. Journal of biological chemistry, 2000, 275(39): 30002-30008.
- [7] YAN D, CHEN D, SHEN J, et al. Bovine lactoferricin is anti-inflammatory and anti-catabolic in human articular cartilage and synovium[J]. Journal of cellular physiology, 2013, 228(2): 447-456.
- [8] MADER J S, SALSAMAN J, CONRAD D M, et al. Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines[J]. Molecular cancer therapeutics, 2005, 4(4): 612-624.
- [9] WIBOWO D, ZHAO C X. Recent achievements and perspectives for large-scale recombinant production of antimicrobial peptides[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2019, 103(2): 659-671.
- [10] KOSOBOKOVA E N, SKRYPNIK K A, KOSORUKOV V S. Overview of fusion tags for recombinant proteins[J]. Biochemistry (Moscow), 2016, 81(3): 187-200.
- [11] MALAKHOV M P, MATTERN M R, MALAKHOVA O A, et al. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins[J]. Journal of structural and functional genomics, 2004, 5(1-2): 75-86.
- [12] RAO X C, HU J S, LI S, et al. Design and expression of peptide antibiotic hPAB- β as tandem multimers in *Escherichia coli*[J]. Peptides, 2005, 26(5): 721-729.

- [13] ZHOU L,ZHAO Z,LI B,et al. TrxA mediating fusion expression of antimicrobial peptide CM4 from multiple joined genes in *Escherichia coli*[J]. Protein expression and purification,2009,64(2):225–230.
- [14] 乔录新,张世杰,石英,等.基于同尾酶技术构建 CCL3L1 基因串联重组质粒的方法[J]. 现代生物医学进展,2012,12(2):239–241,234.
- [15] 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 expression and purification,2008,57(2):303–311.
- [16] CHEN X,SHI J,CHEN R,et al. Molecular chaperones (TrxA,SUMO,Intein, and GST) mediating expression, purification, and antimicrobial activity assays of plectasin in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and applied biochemistry,2015,62(5):606–614. .
- [17] WEI X,WU R,ZHANG L,et al. Expression,purification,and characterization of a novel hybrid peptide with potent antibacterial activity[J]. Molecules,2018,23(6):1491.
- [18] YADAV D K,YADAV N,YADAV S,et al. An insight into fusion technology aiding efficient recombinant protein production for functional proteomics[J]. Archives of biochemistry biophysics,2016,612:57–77. .
- [19] LIU H,HAN Y,FU H,et al. Construction and expression of sTRAIL-melittin combining enhanced anticancer activity with antibacterial activity in *Escherichia coli*[J]. Applied microbiology biotechnology,2013,97(7):2877–2884.
- [20] ZHANG J,MOVAHEDI A,WEI Z,et al. High-level SUMO-mediated fusion expression of ABP-dHC-cecropin A from multiple joined genes in *Escherichia coli*[J]. Analytical biochemistry,2016,509:15–23.
- [21] LIN C H,PAN Y C,LIU F W,et al. Prokaryotic expression and action mechanism of antimicrobial LsGRP1C recombinant protein containing a fusion partner of small ubiquitin-like modifier[J]. Applied microbiology biotechnology,2017,101(22):8129–8138.
- [22] KIM D S,KIM S W,SONG J M,et al. A new prokaryotic expression vector for the expression of antimicrobial peptide abaecin using SUMO fusion tag[J]. BMC biotechnology,2019,19(1):13.
- [23] MA W,LI X,WANG Q,et al. Tandem oligomeric expression of metallothionein enhance heavy metal tolerance and bioaccumulation in *Escherichia coli*[J]. Ecotoxicology and environmental safety,2019,181:301–307.
- [24] LEE C D,SUN H C,HU S M,et al. An improved SUMO fusion protein system for effective production of native proteins[J]. Protein science,2008,17(7):1241–1248.
- [25] MO Q,FU A,LIN Z,et al. Expression and purification of antimicrobial peptide AP2 using SUMO fusion partner technology in *Escherichia coli*[J]. Letters in applied microbiology,2018,67(6):606–613. .
- [26] ARIAS M,HILCHIE A L,HANEY E F,et al. Anticancer activities of bovine and human lactoferricin-derived peptides[J]. Biochemistry and cell biology,2017,95(1):91–98.
- [27] PEREIRA C S,GUEDES J P,GONCALVES M,et al. Lactoferrin selectively triggers apoptosis in highly metastatic breast cancer cells through inhibition of plasmalemmal V-H⁺-ATPase[J]. Oncotarget,2016,7(38):62144–62158.
- [28] GUEDES J P,PEREIRA C S,RODRIGUES L R,et al. Côte-Real M1. Bovine milk lactoferrin selectively kills highly metastatic prostate cancer PC-3 and osteosarcoma MG-63 cells *in vitro*[J]. Frontiers in oncology,2018,8:200.
- [29] JIANG R,LONNERDAL B. Bovine lactoferrin and lactoferricin exert antitumor activities on human colorectal cancer cells (HT-29) by activating various signaling pathways[J]. Biochemistry and cell biology,2017,95(1):99–109.

[责任编辑:黄 敏]