

谢 昆,王丽仙,王 靖,等. 家蚕抗菌肽基因 *BmMoricin* 的克隆及重组蛋白的自诱导表达[J]. 江苏农业科学,2017,45(21):52-54.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.014

家蚕抗菌肽基因 *BmMoricin* 的克隆 及重组蛋白的自诱导表达

谢 昆^{1,2}, 王丽仙¹, 王 靖¹, 朱灵明¹, 尹建华¹, 叶青霞¹, 孙 艳¹

(1. 红河学院生命科学与技术学院, 云南蒙自 661199; 2. 云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室, 云南蒙自 661199)

摘要: 抗菌肽是构成昆虫体液免疫的主要方式, *BmMoricin* 是家蚕免疫系统中 1 种重要的抗菌肽, 具有极强的抑菌活性。以家蚕中肠组织总 RNA 为模板, 设计 1 对特异性引物, 通过 RT-PCR 技术扩增 *BmMoricin*, 构建 pET32a-*BmMoricin* 原核表达载体, 采用自诱导表达系统表达 *BmMoricin* 重组蛋白。结果表明, *BmMoricin* 基因片段的大小为 201 bp, 编码 66 个氨基酸, 自诱导表达的 *BmMoricin* 重组蛋白大小约为 19 ku, 表达产率比异丙基- β -D-疏基半乳糖苷(IPTG)诱导的重组蛋白表达产率高, 为 *BmMoricin* 抗菌肽的生物学活性鉴定及应用奠定了基础。

关键词: 家蚕; 抗菌肽; *BmMoricin*; 重组蛋白; 自诱导

中图分类号: Q785; S881.2⁺4

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2017)21-0052-03

在昆虫细胞中, 天然免疫是主要的免疫屏障, 抗菌肽在阻止微生物入侵和预防感染方面具有重要的作用。抗菌肽具有分子量低、热稳定性强、抗菌性广谱、抑菌活性强等优点^[1], 绝大部分的抗菌肽由复杂的基因家族编码, 因此大量的抗菌

肽是宿主抵抗微生物感染的主要方式^[2-3]。在细胞内抗菌肽的诱导表达受 Toll 和 IMD 信号途径的调控^[4], 然而, 抗菌肽的生物学功能也各有差异, 抗菌肽 Cecropins 和 Moricin 具有极强的抗革兰氏阳性和革兰氏阴性菌活性, 但抗真菌活性较弱, 而 Drosomycin 具有极强的抗真菌活性, 不同的抗菌肽家族成员之间抗菌机理也不同^[5-6]。在家蚕细胞中, 家蚕抗菌肽 *BmMoricin* 最先是家蚕血淋巴中分离得到, 主要对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌有抑菌活性, *BmMoricin* 包含 61 个氨基酸残基, 前 22 个形成预测的分泌肽, 成熟的 *BmMoricin* 含 39 个氨基酸, 通过其氨基端 α -螺旋插入到细菌质膜, 增加细菌的渗透压来抗革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌, 在 *BmMoricin* 家族的 12 个基因成员中, 含 8 个 B 亚家族

收稿日期: 2016-06-30

基金项目: 云南省大学生创新创业训练计划(编号: DCXM163018); 红河学院大学生科技创新项目(编号: SZ1520); 红河学院应用型科学研究项目(编号: XJY15Z07); 红河学院博士专项(编号: XJ15B13)。

作者简介: 谢 昆(1975—), 男, 云南昆明人, 博士, 副教授, 主要从事动物生物化学与分子生物学研究。E-mail: xk_biology2@126.com。

能是解决中国兰杂交种萌发困难、萌发时间长问题的关键。

春兰的组培快繁是实现规模化生产的重要前提, 植物组培用培养基有固体培养基和液体培养基, 液体培养基相对固体培养基组织培养量大, 可培养时间长, 工序简单, 节省成本, 本研究结果证明液体培养基增殖培养和诱芽培养效果优于固体培养基, 与已有研究报道^[11-13]一致, 但还未受到广泛关注, 液体培养方式对于春兰大规模组培快繁有很高的应用价值, 可尝试推广。

参考文献:

- [1] 李子红, 贾 燕. 珍品兰花快速繁殖与养护[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006.
- [2] 徐 程, 詹忠根, 张 铭. 中国兰的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(2): 171-174.
- [3] 黄 磊, 贺筱蓉, 郑立明. 春兰种子非共生萌发的研究[J]. 种子, 2003, 132(6): 40-41.
- [4] 孙崇波, 刘 玫, 施季森. 蕙兰种子无菌萌发及植株再生[J]. 浙江农业学报, 2008, 20(4): 231-235.
- [5] 庞惠仙, 杨红明, 马 骏, 等. 春兰、豆瓣兰、莲瓣兰和春剑 4 种国

- 兰种子萌发特性研究初报[J]. 西部林业科学, 2010, 39(3): 56-60.
- [6] 孟 英, 闻永慧, 李慧敏, 等. 虎雪兰与朱砂兰、蕙兰正反交育种及种子无菌萌发与增殖研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(13): 3812-3814.
- [7] 张志胜, 何琼英, 傅雪琳, 等. 中国兰花远缘杂交及杂交种子萌发的研究[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(2): 62-65.
- [8] 朱根发, 王碧青, 陈明莉, 等. 大花蕙兰与兰属植物种间杂交研究[J]. 植物学通报, 2005, 22(4): 445-448.
- [9] 曾碧玉, 常 强, 许传俊. 杂交兰品种“韩国小姐”与墨兰品种“企剑黑墨”杂交坐果及无菌播种研究[J]. 热带作物学报, 2015, 36(3): 510-515.
- [10] 朱根发, 陈明莉, 罗智伟, 等. 墨兰与大花蕙兰种间杂种原球茎的诱导及增殖研究[J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 688-690.
- [11] 孙 叶, 包建忠, 刘春贵, 等. 春兰杂交种子无菌萌发及根状茎增殖的研究[J]. 金陵科技学院学报, 2012, 28(1): 76-79.
- [12] 陈银龙. 国兰无菌播种技术研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(17): 4291.
- [13] 王利民. 大花蕙兰杂交育种研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2007.

(BmMorcin B1 ~ B8)、3 个 A 亚家族 (BmMorcin LA1 ~ LA3)、1 个 *BmMorcin* 基因,它们在家蚕抵抗革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌方面具有极其重要的作用^[7]。自诱导表达系统是 Studier 于 2005 年发现的,该系统含有一定比例的葡萄糖和乳糖,葡萄糖耗尽后乳糖才被利用,目的蛋白开始表达^[8]。自诱导表达的最终菌体密度大,蛋白产量高,而且没有毒性,适于重组蛋白的高效表达^[9]。本研究以 5 龄 7 d 家蚕中肠组织为材料,设计特异性引物,通过反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 技术扩增 *BmMorcin* 基因,构建 pET32a-BmMorcin 原核表达载体,采用自诱导表达系统表达 BmMorcin 重组蛋白,以期对 BmMorcin 抗菌肽的抑菌活性研究和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

家蚕 (青松×皓月),由云南省蒙自市家蚕养殖户提供。质粒小量提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒,均购自爱思进生物技术 (杭州) 有限公司;RNAiso Plus,购自宝生物工程 (大连) 有限公司;T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶,均购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司;DL2000 DNA marker、RT-PCR 试剂盒、高分子量预染蛋白 marker,均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。LB 培养基:称取 10.0 g 胰蛋白胨、5.0 g 酵母抽提物、10.0 g 氯化钠,加入 950 mL 蒸馏水中,搅拌直至完全溶解,用 10 mol/L 的 NaOH 调节 pH 值为 7.4,以蒸馏水定容至 1 000 mL,105 kPa 高压灭菌 20 min;ZYM-5052 培养基:精确称取 7.098 g Na₂HPO₄·6.804 5 g KH₂PO₄、11.090 5 g NH₄Cl、0.710 2 g Na₂SO₄·0.240 72 g MgSO₄·0.222 g CaCl₂·0.198 g MnCl₂·0.288 g ZnSO₄·0.047 g NiCl₂·0.048 4 g NaMoO₄·0.012 g H₃BO₃·5 mL 甘油、0.6 g 葡萄糖、2 g 乳糖,加入 950 mL 蒸馏水中,搅拌直至完全溶解,以蒸馏水定容至 1 000 mL,105 kPa 高压灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 上公布的 *BmMorcin* (AB006915.1) mRNA 序列,应用 Primer Primer 5.0 引物设计软件设计 1 对特异性引物为 F:5'-CATGCCATGGCAAAAATACCTATCAAGGCCATTAAGACTGTAGGAAAGGCAGTCGGTA-3', R:5'-CCGCTCGAGTCAATGCTTTCTTTCTTCGGTTTCAAGAAATTGAAAACATC-3',下划线部分为限制性内切酶识别位点,引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.2.2 总 RNA 提取及 RT-PCR 扩增 取 5 龄 7 d 家蚕的中肠组织,应用 RNAiso Plus 提取其总 RNA,提取方法参考《分子克隆实验指南》^[10]。应用宝生物工程 (大连) 有限公司的 PrimeScript™ One Step RT-PCR 试剂盒,RT-PCR 扩增出 *BmMorcin* 抗菌肽基因,2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

1.2.3 表达载体的连接、转化及鉴定 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物,用 *Nco* I、*Xho* I 双酶切 *BmMorcin* 基因和 pET32a 载体,构建 pET32a-BmMorcin 原核表达载体,质粒的连接、转化、酶切鉴定、PCR 鉴定等操作方法均参考《分子克隆实验指南》^[10]。

1.2.4 重组蛋白的异丙基-β-D-氨基半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达 构建的重组质粒转化 BL21 感受态细胞,加入终浓

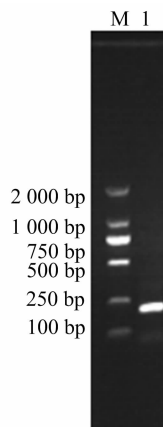
度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达重组蛋白,分别收集诱导 0~6 h 的菌液,聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测重组蛋白的表达情况。

1.2.5 重组蛋白的自诱导表达 按照 Studier 的方法进行自诱导表达研究^[8]。挑取含有重组质粒的单菌落,接种到 4 mL 含有 100 μg/mL 氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 培养基中,37 ℃、220 r/min 培养过夜,再按 1% 的接种量接种到 10 mL 含有 100 μg/mL Amp 的 ZYM-5052 培养基中,37 ℃、220 r/min 培养 12、14、16、18、20、22 h 后收集菌液,与 IPTG 诱导的菌液进行 SDS-PAGE 检测分析,比较两者重组蛋白表达产率的差异。

2 结果与分析

2.1 家蚕抗菌肽基因的 RT-PCR 扩增

以 5 龄 7 d 时期家蚕的中肠组织总 RNA 为模板,通过 RT-PCR 技术扩增家蚕抗菌肽基因 *BmMorcin*。由图 1 可知,目的基因片段的大小约为 201 bp,可以编码 66 个氨基酸,与预期结果一致。



M—DNA 2000 marker; 1—*BmMorcin* 基因的 RT-PCR 扩增结果

图1 家蚕抗菌肽基因的 RT-PCR 扩增结果

2.2 表达载体的构建

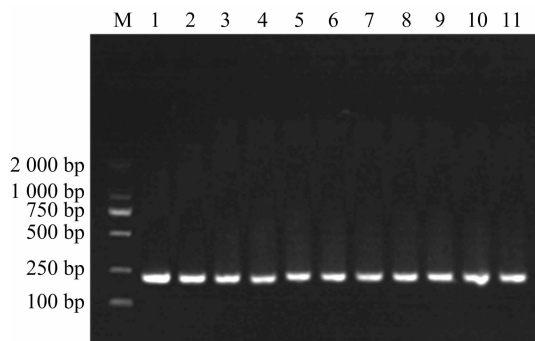
构建 pET32a-BmMorcin 原核表达载体,转化 BL21 感受态细胞,提取重组质粒,PCR 和 *Nco* I、*Xho* I 双酶切鉴定结果如图 2、图 3 所示。从图 2 可以看出,经 PCR 鉴定重组质粒的大小与图 1 中 RT-PCR 的结果一致;从图 3 的重组质粒的双酶切鉴定结果可以看出,大片段为 pET32a 载体片段,小片段为酶切后的 *BmMorcin* 小片段。

2.3 抗菌肽重组蛋白的自诱导表达

抗菌肽分别经 1 mmol/L IPTG 诱导 0、1、2、3、4、5、6 h 和自诱导表达 12、14、16、18、20、22 h 后,由图 4 可知,IPTG 和自诱导表达系统皆能成功表达 *BmMorcin* 重组蛋白 (箭头所指),表达的重组蛋白大小为 19 ku,自诱导系统组表达的重组蛋白产率明显高于 IPTG 诱导组。

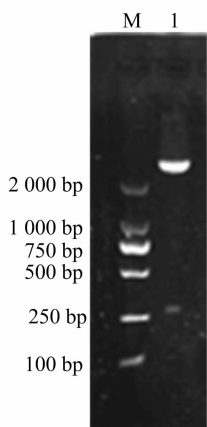
3 讨论

昆虫是一类进化上较为低等的动物,同时也是世界上种类和数量最多的动物。面对大量的外源微生物的侵害,虽然没有类似于哺乳动物的特异性免疫系统,但是仍然能够较好



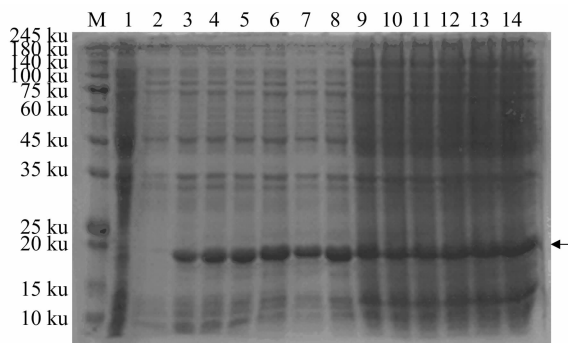
M—DNA marker; 1~11—含 pET32a-BmMoricin 质粒的菌液 PCR 鉴定结果

图2 重组质粒的 PCR 鉴定结果



M—DNA marker; 1—pET32a-BmMoricin 重组质粒的双酶切鉴定结果

图3 重组质粒的双酶切鉴定结果



M—蛋白 marker; 1—含 pET32a 空质粒的菌液; 2~8—IPTG 诱导 0、1、2、3、4、5、6 h 的重组菌株; 9~14—自诱导 12、14、16、18、20、22 h 的重组菌株

图4 BmMoricin 抗菌肽表达产率的 SDS-PAGE 检测结果

地生存,说明昆虫必定有对非特异因子产生免疫应答的高效先天免疫系统,昆虫的免疫系统由体液免疫和细胞免疫组成^[11]。昆虫的体液免疫与高等动物有明显的差异,主要依赖血液中的抗菌肽和蛋白质。当昆虫机体受到病原微生物侵袭时,体内的识别蛋白能够识别微生物表面的肽聚糖或脂多糖及其他物质,引发丝氨酸蛋白酶和解除丝氨酸蛋白酶抑制剂的细胞外级联反应,激活细胞内信号转导途径,最终在其脂肪体、血液、中肠和表皮等器官或组织中诱导产生抗菌肽,进而杀灭外源微生物^[12]。2006 年 Cheng 等通过对家蚕基因组框架图序列的搜寻,找到了 35 条抗菌肽基因序列^[2]。Moricin

是由 Hara 等首先从家蚕血淋巴中分离得到的,对革兰阴性菌和革兰阳性菌均有强烈的抗菌活性,家蚕抗菌肽 moricin (BmMoricin) 由 61 个氨基酸残基组成,在其 N-末端部分每隔 3~4 个氨基酸残基就有带电荷氨基酸,只形成 1 个长的具有亲水脂性质的 α -螺旋结构,在 C-末端则存在碱性氨基酸残基串,没有发现 BmMoricin 有氨基酸的修饰,其抗菌机制可能是利用碱性 C 端与细胞膜表面作用,然后利用 N 端改变膜的通透性,形成离子通道^[13]。BmMoricin 的等电点高达 12.0,对细菌的抗性明显高于 BmCecropin 家族各成员^[13]。

本研究通过 RT-PCR 技术从 5 龄 7 d 家蚕中肠组织中克隆 BmMoricin 抗菌肽基因,构建 pET32a-BmMoricin 重组表达载体,采用自诱导表达系统在大肠杆菌中对重组蛋白进行自诱导表达,SDS-PAGE 检测结果表明,自诱导系统组的重组蛋白表达产率明显高于 IPTG 诱导组。试验结果为家蚕抗菌肽的纯化、活性鉴定奠定了基础。

参考文献:

- [1] Sackton T B, Lazzaro B P, Schlenke T A, et al. Dynamic evolution of the innate immune system in *Drosophila* [J]. *Nature Genetics*, 2007, 39(12): 1461-1468.
- [2] Cheng T C, 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.
- [3] Tanaka H, Ishibashi J, Fujita K, et al. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 38(12): 1087-1110.
- [4] Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster* [J]. *Annual Review of Immunology*, 2007, 25(1): 697-743.
- [5] Samakovlis C, Kimbrell D A, Kylsten P, et al. The immune response in *Drosophila*: pattern of cecropin expression and biological activity [J]. *EMBO Journal*, 1990, 9(9): 2969-2976.
- [6] Ekengren S, Hultmark D. *Drosophila* cecropin as an antifungal agent [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 29(11): 965-972.
- [7] Hemmi H, Ishibashi J, Hara S, et al. Solution structure of moricin, an antibacterial peptide, isolated from the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Febs Letters*, 2002, 518(1/2/3): 33-38.
- [8] Studier F W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures [J]. *Protein Expression and Purification*, 2005, 41(1): 207-234.
- [9] 冯 杉. T7 表达系统及自诱导蛋白产出策略 [J]. *北京教育学院学报(自然科学版)*, 2009, 4(3): 10-15.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster* [J]. *Annual Review of Immunology*, 2007, 25(1): 697-743.
- [12] Kimbrell D A, Beutler B. The evolution and genetics of innate immunity [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2001, 2(4): 256-267.
- [13] Hara S, Yamakawa M. Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(50): 29923-29927.