

胡珊珊,陈开莉,陈红贤,等.黑水虻抗菌肽的克隆及其生物信息学分析[J].江苏农业科学,2020,48(24):49-52.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.24.009

黑水虻抗菌肽的克隆及其生物信息学分析

胡珊珊,陈开莉,陈红贤,邬开鑫,尤忠毓

(嘉兴学院生物与化学工程学院,浙江嘉兴 314001)

摘要:为了开发新型昆虫抗菌肽资源,以黑水虻幼虫为研究对象,采用 RT-PCR 技术从黑水虻幼虫总 RNA 中扩增到一个新型抗菌肽基因 DLP-5,并利用在线生物软件和工具分析了抗菌肽 DLP-5 的生物信息学特征。结果表明,DLP-5 由 40 个氨基酸残基组成,分子量为 4 226.83 u,等电点为 7.87,具有两性特征,其中 N 端为疏水性,C 端为亲水性,具有 3 个磷酸化位点,无糖基化位点、信号肽序列和跨膜区。DLP-5 的三级结构包含 1 个 N 端的 loop 区、1 个 α 螺旋和 1 对反向平行 β 折叠,构成了防御素类抗菌肽典型的“环-螺旋-折叠”结构,说明 DLP-5 是一个新型的防御素类抗菌肽,可通过与微生物膜相互作用发挥其抗菌活性。

关键词:昆虫抗菌肽;黑水虻;基因克隆;生物信息学

中图分类号: S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)24-0049-04

昆虫抗菌肽是昆虫受到刺激或感染后由体内血淋巴产生的一类小分子碱性多肽,经体内和体外的抗菌活性研究发现,它具有广谱抗菌活性、分子量小、容易合成、不易形成耐药性等特性,可作为传统抗生素的潜在替代抗菌制剂^[1-2]。黑水虻(*Hermitia illucens* L.)是双翅目水虻科扁角水虻属的一种资源昆虫,其幼虫以动物粪便、腐烂的有机物及植物性垃圾为食,在禽畜粪便及餐厨垃圾的无害化处理中应用前景广阔^[3]。夏婧等利用大肠杆菌和金黄色葡萄球菌诱导黑水虻幼虫产生抗菌肽,该抗菌肽可以有效抑制大肠杆菌的生长,稳定性研

究发现,黑水虻抗菌肽具有很好的热稳定性、反复冻融性^[4-5]。Park 等利用 cDNA 末端快速扩增技术从黑水虻幼虫的 cDNA 中成功克隆了抗菌肽编码基因 DLP1-DLP4^[6];Li 等在毕赤酵母中重组表达了黑水虻抗菌肽 DLP2 和 DLP4,活性研究表明 DLP2 和 DLP4 具有较强的抗菌性能,特别是对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌具有快速的杀灭活性,其最小杀菌浓度(MIC)为 0.01 $\mu\text{mol/L}$ ^[7]。Elhag 等从黑水虻幼虫的 cDNA 中筛选到了 7 种抗菌肽基因 [*cecropinZ1*、*sarcotoxin1*、*sarcotoxin* (2a)、*sarcotoxin* (2b)、*sarcotoxin3*、*stomoxynZHI* 和 *stomoxynZHI* (a)],并利用大肠杆菌表达系统成功表达了 *stomoxynZHI*,活性研究表明,重组 *stomoxynZHI* 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)均具有较高的抗菌活性^[8]。由此可见,黑水虻及其幼虫体内含有丰富的内源性抗菌肽,本试验旨在克隆新型黑水虻抗菌

收稿日期:2020-04-29

基金项目:浙江省嘉兴市科技计划(编号:2017AY33087);嘉兴学院大学生科研训练计划(编号:8517193164)。

作者简介:胡珊珊(1999—),女,浙江绍兴人,主要从事天然产物开发研究。E-mail:1443767113@qq.com。

通信作者:尤忠毓,博士,副教授,主要从事天然产物开发研究。E-mail:elmer0718@163.com。

[18] Summer E J, Berry J, Tran T, et al. Rz/RzI lysis gene equivalents in phages of Gram-negative hosts [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 373(5): 1098-1112.

[19] Lu N, Sun Y, Wang Q Q, et al. Cloning and characterization of endolysin and holin from *Streptomyces avermitilis* bacteriophage phiSASD1 as potential novel antibiotic candidates [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 147: 980-989.

[20] Saier M H Jr, Reddy B L. Holins in bacteria, eukaryotes, and archaea: multifunctional xenologues with potential biotechnological

and biomedical applications [J]. *Journal of Bacteriology*, 2015; 197: 7-17.

[21] Park S Y, Jy L, Chang W S, et al. A coupling process for improving purity of bacterial minicells by holin/lysin [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 86(1): 108-110.

[22] Heineman R H, Molineux I J, Bull J J. Evolutionary robustness of an optimal phenotype: re-evolution of lysis in a bacteriophage deleted for its lysis gene [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 61(2): 181-191.

肽,并对其进行生物信息学分析,为进一步开发黑水虻抗菌肽资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

Taq Plus DNA Polymerase、柱式动物总 RNA 抽提纯化试剂盒、一步法 RT-PCR 扩增试剂盒、质粒 DNA 抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、*E. coli* DH5 α 感受态细胞和克隆载体 pUCm-T 购买于生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 黑水虻抗菌肽基因的克隆 根据已报道的黑水虻抗菌肽编码序列^[6],利用 Primer Premier 5 设计简并引物 HIP-1:5'-GCMACCTGTGAYCTSTTGAGYCC-3',HIP-2:5'-DYKYCKGCARTTRCAAA CRGCTC-3',引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。利用大肠杆菌与金黄色葡萄球菌混合菌液诱导黑水虻幼虫产生抗菌肽^[5],采用柱式动物总 RNA 抽提纯化试剂盒提取其幼虫的总 RNA。以总 RNA 为模板,采用一步 RT-PCR 扩增试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,并直接扩增出目的片段,反应体系参照试剂盒说明。反应条件:45 ℃ 30 min;94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 10 min;4 ℃ 保持。PCR 产物经 2% 的琼脂凝胶电泳检测,采用 DNA 胶回收试剂盒回收目的基因。将胶回收得到的目的片段与 pUCm-T 进行连接,连接体系:连接缓冲液 1 μ L;胶回收产物 7 μ L; T_4 DNA 连接酶 1 μ L;pUCm-T 1 μ L。混合均匀后 16 ℃ 恒温连接 16 h,连接产物转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,利用菌落 PCR 鉴定阳性克隆,利用质粒 DNA 抽提试剂盒提取阳性克隆的重组质粒送生工生物工程(上海)有限公司测序。

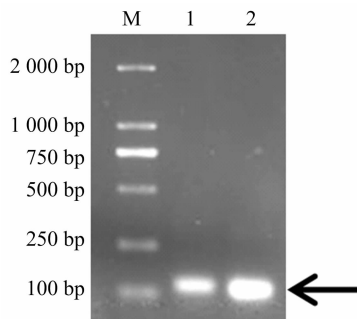
1.2.2 黑水虻抗菌肽基因的生物信息学分析 利用软件 DNAMAN 对测序结果进行分析,查找开放阅读框;利用 NCBI-Blast 在线工具对氨基酸序列的相似性进行比对;利用 ProtParam 在线工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)对抗菌肽的氨基酸理化性质进行分析;利用 TMHMM Server v. 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)分析抗菌肽的跨膜结构;利用 SignalP 5.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析抗菌肽的信号肽;利用 ProtScale(<https://web.expasy.org/protscale/>)对抗菌肽的疏水性进行分析;利用 NetPhos 3.1 Server

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)分析抗菌肽的磷酸化位点;利用 NetOGlyc 4.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>)分析抗菌肽的糖基化位点;利用 SWISS-MODEL 在线服务(<http://www.swissmodel.expasy.org/>)进行同源建模,构建抗菌肽的三级结构模型。

2 结果与分析

2.1 黑水虻抗菌肽基因的克隆

以菌液浸泡后的黑水虻幼虫为原料,提取总 RNA,利用 HIP-1 和 HIP-2 为引物进行一步 RT-PCR 扩增。扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳分析,结果发现在 120bp 左右有特异性条带(图 1)。将 PCR 产物胶回收纯化后与 T 载体连接,转化于 *E. coli* DH-5 α 感受态细胞中,挑选 9 个重组子进行培养后提取质粒,并送生工生物工程(上海)有限公司测序。根据测序结果获得的多肽序列与已知的黑水虻抗菌肽序列比对结果如图 2 所示,其中 3 条序列与文献报道的黑水虻抗菌肽(DLP-3)序列相同^[6],另有 1 条的序列与报道序列存在多个氨基酸的差异,将其命名为 DLP-5,经 NCBI-Blast 在线工具比对,未发现与 DLP-5 完全相同的序列,因此,DLP-5 为新抗菌肽序列。



M 为 DNA marker; 泳道 1、2 为 PCR 产物
图1 PCR 产物电泳

2.2 抗菌肽 DLP-5 的理化性质

利用 ProtParam 在线工具对抗菌肽 DLP-5 的理化性质进行了分析,结果见表 1。DLP-5 由 40 个氨基酸残基组成,其分子式为 $C_{173}H_{278}N_{58}O_{54}S_6$,分子量 4 226.83 u,等电点 7.87。经预测,DLP-5 在哺乳动物细胞中的半衰期为 4.4 h,在酵母菌和大肠杆菌中的半衰期均大于 10 h。DLP-5 的亲水性平均系数为 -0.068,说明其为亲水性蛋白。

2.3 抗菌肽 DLP-5 的跨膜区和信号肽分析

利用 TMHMM Server v. 2.0 和 SignalP 5.0 对抗

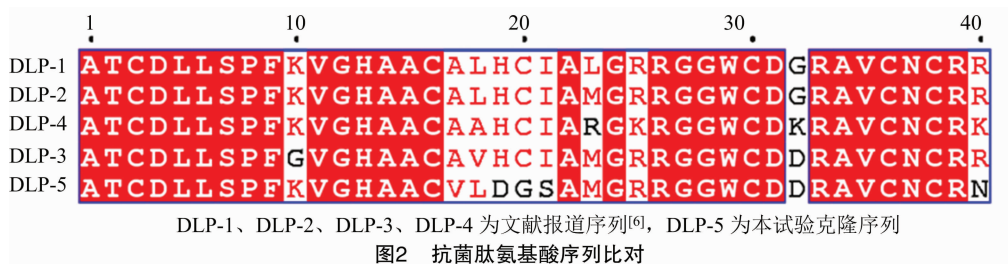


图2 抗菌肽氨基酸序列比对

表 1 抗菌肽 DLP-5 的理化性质

项目	结果
氨基酸数量(个)	40
分子量(u)	4226.83
等电点	7.87
正电荷氨基酸总数(Arg + Lys)(个)	5
负电荷氨基酸总数(Asp + Glu)(个)	4
在哺乳动物细胞中半衰期(h)	4.4
在酵母菌中半衰期(h)	>20
在大肠杆菌中半衰期(h)	>10
不稳定指数	55.12
脂溶性指数	63.50
亲水性平均系数	-0.068

菌肽 DLP-5 的跨膜结构和信号肽进行分析。结果表明,DLP-5 没有跨膜区和信号肽,因此,抗菌肽 DLP-5 很可能是位于细胞质中的胞浆蛋白。

2.4 抗菌肽 DLP-5 的疏水性分析

利用 ProtScale 工具对抗菌肽 DLP-5 的疏水性进行了分析,结果如图 3 所示,正值为疏水,负值为亲水,因此,抗菌肽 DLP-5 明显具有两亲性特征,其 N 端具有疏水性,C 端具有亲水性。结合亲水性平均系数,DLP-5 的总体亲水性大于疏水性。

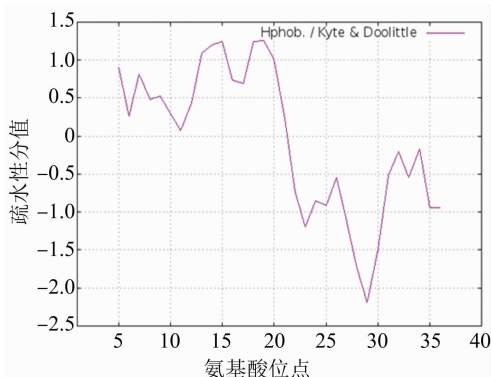


图3 抗菌肽 DLP-5 的疏水性分析结果

2.5 抗菌肽 DLP-5 的糖基化位点和磷酸化位点分析

蛋白质的糖基化和磷酸化是蛋白质翻译后常见的加工方式,对蛋白质功能的发挥具有重要影

响。利用 NetPhos 3.1 和 NetOGlyc 4.0 分别对抗菌肽 DLP-5 的糖基化位点和磷酸化位点进行了分析,结果表明,在 DLP-5 分子内没有糖基化位点,但存在 3 个磷酸化位点,分别为第 2 位的苏氨酸、第 7 位的丝氨酸和第 21 位的丝氨酸(图 4)。

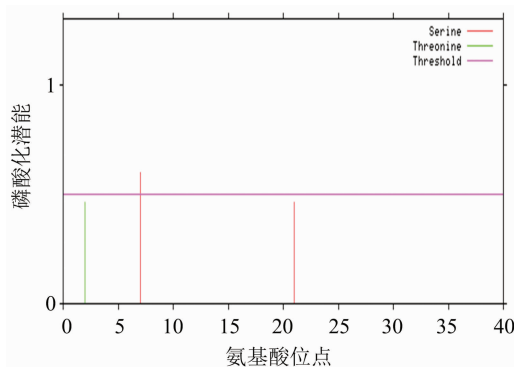


图4 抗菌肽 DLP-5 的磷酸化位点分析结果

2.6 抗菌肽 DLP-5 的高级结构预测

利用 SWISS-MODEL 在线服务对抗菌肽 DLP-5 的三级结构进行了同源建模,构建其结构模型,如图 5 所示。模型显示 DLP-5 包含 1 个 N 端的 loop 区、1 个 α 螺旋和 1 对反向平行 β 折叠,三者构成了一个典型的“环-螺旋-折叠”结构。

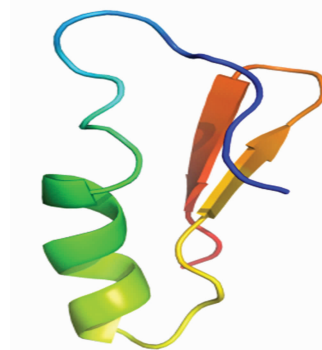


图5 抗菌肽 DLP-5 的三级结构模型

3 讨论

昆虫抗菌肽因具有抗菌活性高、抗菌谱广、不易产生抗药性等特点,越来越受到人们的关注^[9]。为了开发新型的昆虫抗菌肽,本试验以黑水虻幼虫

为原料,通过反转录 PCR 技术从幼虫总 RNA 中扩增得到一条抗菌肽编码基因,该基因所编码的多肽 DLP-5 包含 40 个氨基酸残基,与文献报道的 DLP-1、DLP-2、DLP-3、DLP-4 具有较高的同源性^[6]。

在获得 DLP-5 的氨基酸序列基础上,本研究进行了系统的生物信息学分析。通过理化性质分析表明,DLP-5 属于带正电荷的阳离子型抗菌肽,该类抗菌肽通常可作用于带负电荷的微生物膜,通过桶板模型、毯式模型、超环面模型等方式发挥抗菌作用^[10]。此外,在氨基酸组成上,DLP-5 含有 5 个甘氨酸残基,而富含甘氨酸的抗菌肽大多对革兰氏阴性菌有着较高的抑菌活性^[9]。因此,DLP-5 可能更容易抑制革兰氏阴性菌的生长。

抗菌肽的疏水性对其抑菌活性有较大影响,适当提高其疏水性,可增强抗菌活性^[11]。对 DLP-5 的疏水性分析表明,DLP-5 具有明显的两亲性特征,其 N 端的疏水性强,有利于 DLP-5 与微生物膜的结合,C 端的亲水性强,有利于 DLP-5 在水溶液中的溶解性。虽然两亲性结构有利用抗菌肽的抗菌活性,但需要注意的是完全的两亲性结构在提高抗菌活性的同时,也增加了抗菌肽的细胞毒性。

蛋白质的磷酸化是蛋白质翻译后修饰的重要方式,本试验发现 DLP-5 存在 3 个潜在的磷酸化位点(第 2 位的苏氨酸、第 7 位的丝氨酸和第 21 位的丝氨酸),这些位点可为其表面修饰的发生提供可能,而实际的磷酸化情况还需进行更深入的研究。

抗菌肽的三级结构对其抑菌活性也有重要影响。本试验通过同源建模的方式构建了 DLP-5 的三级结构,结果显示 DLP-5 显现出一种“环-螺旋-折叠”的结构。该结构特征与大多数昆虫防御素的结构相似,都具有 N 端 loop、单个 α -螺旋和 2 个反平行的 β 折叠结构域^[12]。因此,DLP-5 可能属于昆虫防御素类抗菌肽家族。

综上所述,本试验通过分子生物学技术从黑水

虻幼虫中克隆了一种新型抗菌肽 DLP-5,利用相关生物软件及在线工具分析了 DLP-5 的生物信息学特征,为后续 DLP-5 的基因工程制备奠定了理论基础,也为深入理解 DLP-5 的作用机制提供了理论参考。

参考文献:

- [1] Tonk M, Vilcinskas A. The medical potential of antimicrobial peptides from insects [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2017, 17(5): 554-575.
- [2] Wu Q, Patočka J, Kuča K. Insect antimicrobial peptides, a mini review [J]. *Toxins*, 2018, 10(11): E461.
- [3] da Silva G D P, Hesselberg T. A review of the use of black soldier fly larvae, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae), to compost organic waste in tropical regions [J]. *Neotropical Entomology*, 2020, 49(2): 151-162.
- [4] 夏 婧, 赵启凤, 廖 业, 等. 黑水虻抗菌肽粗提物生物学稳定性观察[J]. *山东医药*, 2013, 53(36): 91-92.
- [5] 夏 婧, 赵启凤, 廖 业, 等. 黑水虻抗菌肽诱导条件优化及粗提物活性研究[J]. *环境昆虫学报*, 2013, 35(1): 44-48.
- [6] Park S I, Kim J W, Yoe S M. Purification and characterization of a novel antibacterial peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2015, 52(1): 98-106.
- [7] Li Z, Mao R, Teng D, et al. Antibacterial and immunomodulatory activities of insect defensins - DLP2 and DLP4 against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 12124.
- [8] Elhag O, Zhou D, Song Q, et al. Screening, expression, purification and functional characterization of novel antimicrobial peptide genes from *Hermetia illucens* (L.) [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169582.
- [9] 王 龙, 冯 群, 高嘉敏, 等. 昆虫抗菌肽分类及在医学中应用[J]. *环境昆虫学报*, 2017, 39(6): 1387-1396.
- [10] 张冰清, 杭柏林, 夏一赫, 等. 牛血红蛋白源抗菌肽 BHP 的生物信息学分析[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(17): 17-19.
- [11] 赵连静, 黄宣兵, 高 嵩, 等. 螺旋型抗菌肽的疏水性对抗细菌与抗真菌活性的影响比较[J]. *中国科学(化学)*, 2013, 43(8): 1041-1050.
- [12] Koehbach J. Structure - activity relationships of insect defensins [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2017, 5: 45.