

利用 ELP-Intein 系统在大肠杆菌中生产抗菌肽 DLP4

姜宇, 李秀, 林瑛

东华大学 化学化工与生物工程学院, 上海 201620

姜宇, 李秀, 林瑛. 利用 ELP-Intein 系统在大肠杆菌中生产抗菌肽 DLP4. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2365-2376.

JIANG Y, LI X, LIN Y. Production of antimicrobial peptide DLP4 in *Escherichia coli* using an ELP-Intein system. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2365-2376.

摘要: DLP4 (defensin-like peptide 4) 是一种新型昆虫防御素抗菌肽, 对革兰氏阳性细菌具有强大的抗菌活性而且不易产生抗药性。本研究利用类弹性蛋白 (elastin-like polypeptide, ELP) 的相变特性和蛋白质内含子 (intein, I) 的 C 端断裂系统, 通过构建重组表达质粒 pET-ELP-I-DLP4, 以大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 作为宿主细胞, 诱导表达后的重组蛋白通过简单的离心、pH 和温度转变进行纯化得到 DLP4。研究中发现, 在表达纯化过程中蛋白质内含子发生了 C 端提前断裂。为了解决这一问题, 将其断裂为 N 端片段 (I_{0N}) 和 C 端片段 (I_{0C}) 后, 分别与 ELP 或 DLP4 融合, 构建了 pET-ELP-I_{0N} 和 pET-ELP-I_{0C}-DLP4 两种重组表达质粒。分别在大肠杆菌中诱导表达, 将表达后的菌液混合, 使蛋白质内含子恢复 C 端断裂活性, 最终得到的 DLP4 的得率约为 1.49 mg/L。抑菌试验证明纯化的 DLP4 表现出预期活性, 这为 DLP4 在原核系统中的表达纯化提供了有效途径。

关键词: 抗菌肽; ELP 标签; 蛋白质内含子; 断裂蛋白质内含子; 抑菌活性

Production of antimicrobial peptide DLP4 in *Escherichia coli* using an ELP-Intein system

JIANG Yu, LI Xiu, LIN Ying

College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China

Abstract: DLP4 (defensin-like peptide 4) is a novel insect defensin, which has strong antibacterial activity against Gram-positive bacteria and is not susceptible to develop drug resistance. In this study, an

Received: November 11, 2021; **Accepted:** February 11, 2022; **Published online:** February 15, 2022

Supported by: Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (19ZR1471000); National Natural Science Foundation of China (31470836)

Corresponding author: LIN Ying. Tel: +86-21-67792648; E-mail: liny@dhue.edu.cn

基金项目: 上海市自然科学基金 (19ZR1471000); 国家自然科学基金 (31470836)

elastin-like polypeptide (ELP) and an intein fusion system were used for production and purification of DLP4, which combined the characteristics of the phase transition of ELP and the C-cleavage of the intein. A recombinant expression plasmid pET-ELP-I-DLP4 was constructed and transformed into *Escherichia coli*. Subsequently, DLP4 was purified by simple centrifugation, alternation of pH and temperature. However, the C-cleavage of the intein occurred unexpectedly during the process of expression and purification. To solve this problem, the intein was split into N-intein (I_{0N}) and C-intein (I_{0C}), and fused with ELP or DLP4 to construct two recombinant expression plasmids pET-ELP- I_{0N} and pET-ELP- I_{0C} -DLP4, respectively. These two plasmids were transformed into *E. coli* separately. The mixture of the two cultures of *E. coli* strains restored the C-cleavage activity of the intein. This operation yielded DLP4 of about 1.49 mg/L. Antibacterial test confirmed that the purified DLP4 exhibited expected activity. Thus, this approach can be used as an effective way for DLP4 expression and purification in the prokaryotic system.

Keywords: antimicrobial peptide; ELP tag; intein; split intein; antibacterial activity

由于抗生素的过度使用, 细菌对抗生素的耐药性日趋严重, 尤其是革兰氏阳性细菌包括金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 对抗生素的耐药性已逐渐对公共安全构成威胁^[1-3]。因此, 寻找抗生素的替代品已成为近年来研究的焦点。抗菌肽 (antimicrobial peptide, AMP) 因其高抗菌活性和低耐药性等优点引起了科学家的关注, 有望成为抗生素的替代品^[4-6]。

抗菌肽存在于大多数生物的先天免疫系统中, 包括微生物、植物和动物等。其中, 昆虫中有一类富含二硫键的肽被称为“昆虫防御素”, 大多由约 40 个氨基酸组成, 具有一个 N 端环、一个 α -螺旋和一个由 3 个二硫键 ($CS\alpha\beta$) 交联的反平行 β -折叠, 它们对各种革兰氏阳性菌具有广谱活性^[7]。DLP4 (defensin-like peptide 4) 是一种两亲性阳离子昆虫防御素, 来自黑水虻 (*Hermetia illucens*), 包含 39 个氨基酸。研究表明, 其对革兰氏阳性菌包括金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等表现出广谱、高效的抗菌活性, 同时又表现出较低的溶血活性、细胞毒性和低耐药性, DLP4 被认为是

一种治疗对革兰氏阳性菌感染的有前途的药物, 故而具有很高的应用价值^[1,8]。研究表明, 抗菌肽本身具有毒性且容易降解, 因而难以在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中直接表达^[9]。研究者在巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中表达, 抗菌肽 DLP4, 诱导表达的蛋白需要通过 AKTExpress 系统或者阳离子交换层析 (SP Sepharose FF) 进一步纯化^[2,7]。这种方法的缺点是需要昂贵的亲和树脂和设备, 这一定程度上增加了纯化时间和经济成本, 因此需要寻求一种新的适用于抗菌肽生产的方法。

为了解决上述的问题, 本研究通过将 ELP (elastin-like polypeptide, E) 与蛋白质内含子 (intein, I) 结合用于在大肠杆菌中生产抗菌肽 DLP4。本实验使用来源于结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的蛋白质内含子 *Mtu RecA Δ I-CM*, 该蛋白质内含子已去除其归巢核酸内切酶结构域, 保留了 1-110 位和 383-440 位的氨基酸而构建成微小蛋白质内含子, 并通过定向进化改进了其对 pH、温度的敏感性以及 C-末端的断裂活性^[10-11]。当蛋白质内含子首位

保守氨基酸突变为丙氨酸时,其会发生 C 端断裂,在弱酸条件下会促进这一反应过程,可以通过降低 pH 和提高温度触发可控的 C-端断裂以释放目的蛋白^[12-13]。此外由于 ELP 标签是一种温度敏感性蛋白,当温度在相变温度 (Tt) 以下,它是可溶的,但当温度高于 Tt 时,它会立即聚集,并且该过程是可逆的。此外,当它与其他蛋白融合表达时,也会保留这种特性^[14-16]。在适当浓度盐离子条件下时,ELP 融合蛋白会发生特异性地聚集。ELP 与 intein 相融合会形成蛋白质自我断裂标签 (类弹性蛋白-蛋白质内含子, ELP-intein, EI), 可以通过简单的离心和温度以及 pH 转变纯化获得不含有蛋白纯化标签的目的蛋白^[17-18]。

本研究首先通过基因工程手段将 DLP4 基因融合在 ELP 和 intein 的下游,在大肠杆菌中诱导表达得到可溶性的融合蛋白 ELP-I-DLP4 (图 1A), 通过 intein 的 C 端断裂可获得抗菌肽 DLP4, 但 intein 在大肠杆菌体内发生了 C 端提前断裂。由于 intein 可构成断裂蛋白质内含子 (split intein), 其结构被分成 N、C 两段导致活性丧失, 当其互补片段存在时, split intein 又可以恢复断裂活性^[19-20]。基于此特性, 将 intein 构建成 split intein, 在大肠杆菌中分别诱导表达得到可溶性的融合蛋白 ELP-I_N 和 ELP-I_C-

DLP4 (图 1B、1C), 随后在体外混合, intein 恢复活性, 诱导 C 端断裂获得抗菌肽 DLP4, 最后通过抑菌实验初步证明通过 ELP-Intein 系统纯化出的 DLP4 保持原有蛋白活性, 具有抗菌活性。

1 材料与方法

1.1 细菌菌株、载体和酶

E. coli DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3) 化学感受态细胞购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 用于抗菌测定的金黄色葡萄球菌 *S. aureus* 以及枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 来自本实验室保存; 用于构建表达载体的载体质粒 pET-ELP-I-CAT 来源于 David W. Wood 教授实验室 (美国俄亥俄州立大学); 限制性内切酶 *EcoR* I、*BsrG* I 和 *Hind* III, T4 DNA 连接酶和 2 \times Phusion Plus Master Mix 购自 Thermo Fisher Scientific (USA)。

1.2 重组表达质粒的构建

基于 ELP-Intein 系统的重组表达质粒的构建。目的基因序列 (DLP4, GenBank 登录号: KF805350) 从文献中获得^[21], 并由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。通过聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR), 利用引物 P1、P2 (表 1) 将 DLP4 基因序列从合成的 pUC57 克隆载体中扩增出来, PCR 产物和表达载体

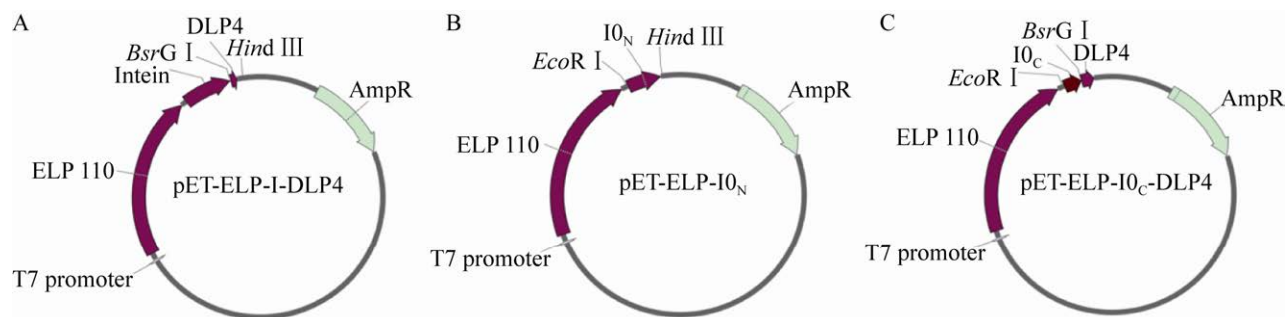


图 1 重组表达质粒示意图

Figure 1 Schematic diagram of recombinant expression plasmid pET-ELP-I-DLP4 (A), pET-ELP-I_N (B) and pET-ELP-I_C-DLP4 (C).

表 1 文中所用引物序列

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
P1	CAT <u>TGTAC</u> CAACGCAACCTGTGACCTGTTGAGC	34
P2	ATGA <u>AGCTT</u> CTATTTCCGGCAGTTGAAACAGC	33
P3	GATTCAGA <u>ATTTC</u> GGCAGTGGATCCGCCCTCGCAGAGGGCACTCGGATC	49
P4	ACCA <u>AGCTT</u> TCAGCCAGACGCCGGAATCGGCGC	33
P5	GGTCGA <u>ATTTC</u> GGCAGTGGATCCCGCGTGCAGGCGCTCGCGGATGCC	46
P6	GTGCATGTT <u>GTGTACA</u> ACAAC	21

Note: the underlined sequences indicate the restriction endonuclease recognition sites.

pET-ELP-I-CAT 分别使用 *Bsr*G I 和 *Hind* III 双酶切, 经回收后的 2 个片段进行连接以构建重组表达质粒 pET-ELP-I-DLP4 (图 1A)。

为了解决蛋白质内含子在大肠杆菌内提前发生 C 端断裂的问题, 需构建基于 split intein-双 ELP 系统的 pET-ELP-I_{0N} 和 pET-ELP-I_{0C}-DLP4 重组表达质粒。构建含有 Δ I-CM 的 N 端开关蛋白表达质粒 (pET-ELP-I_{0N}) 是通过引物 P3 和 P4 (表 1) 将 intein 基因的 N 端序列从重组表达质粒 pET-ELP-I-DLP4 中扩增出来, 随后将载体 pET-ELP-I-DLP4 和 PCR 产物分别使用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切, 经回收后的 2 个片段进行连接以构建重组表达质粒 pET-ELP-I_{0N}。构建 C 端重组表达质粒 (pET-ELP-I_{0C}-DLP4), 使用引物 P5、P6 (表 1) 将 intein 基因的 C 端序列从重组表达质粒 pET-ELP-I-DLP4 中扩增出来, 随后将载体 pET-ELP-I-DLP4 和 PCR 产物分别使用 *Eco*R I 和 *Bsr*G I 双酶切, 经回收后的 2 个片段进行连接以构建重组表达质粒 pET-ELP-I_{0C}-DLP4。所有重组表达质粒都进行测序验证。

1.3 重组融合蛋白的诱导表达与纯化

重组融合蛋白的诱导表达与纯化按照之前报道的方法进行^[22]。而在一步法纯化中, 首先将诱导表达后的前体蛋白 (EI_{0C}-DLP4) 与开关蛋白 (EI_{0N}) 的菌按照湿重 1:2 (W/W) 混

合, 后续按照上述文献中完整蛋白质内含子纯化的方式进行纯化。

1.4 蛋白检测与分析

通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE) 和三羟甲基甘氨酸-十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (n-tris[hydroxymethyl]methylglycine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, Tricine-SDS-PAGE) (生工生物工程 (上海) 股份有限公司) 检测纯化目的蛋白后, 随后通过二喹啉甲酸法 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白浓度测定试剂盒测定其浓度。首先取不同浓度的牛血清白蛋白作为标准品, 通过测定其在 562 nm 处吸收峰的值, 制作标准曲线。接着吸取适量纯化后蛋白溶液测定其吸光值 (OD_{562}), 从而确定其蛋白浓度。

1.5 DLP4 的活性分析

1.5.1 打孔法测定抑菌活性

通过打孔法检测纯化后 DLP4 是否具有抗菌活性。参考文献[22-23]中已报道的方法, 从培养皿中分别挑选 *S. aureus* 与 *B. subtilis* 的单菌落进行培养及转接操作, 分别以抗菌肽 DLP4 (21 μ mol/L) 作为实验组、氨苄青霉素作为阳性对照和 1×PBS 作为阴性对照。

1.5.2 细胞膜破坏活性的检测

为了更直观地观察抗菌肽的体外抗菌活性, 使用碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染料

对细菌细胞进行染色,当细胞膜被破坏时,PI 可以进入细胞并嵌入双链 DNA 内释放红色荧光,但是其不可以穿过完整的细胞膜。即采用 PI 染色法检测 DLP4 对细胞膜完整性的影响。分别采用 *S. aureus* 与 *B. subtilis* 作为检测菌,首先将各检测菌挑单菌落接种至 LB 液体培养基中培养 7–8 h,取适量菌液于 6 200×g 离心 10 min,然后细菌细胞用 100 μL 的 1×PBS (pH 7.4) 重悬,使菌液浓度为 8×10⁸ 细胞/mL。然后用 50 μL 抗菌肽 (21 μmol/L) 在 37 °C 条件下处理 30 min 后,将悬液于 6 200×g 离心 10 min 收集细胞,接着将细胞悬浮于 100 μL 含有 1 mg/mL PI 的 1×PBS 中,在 30 °C 下避光孵育 30 min 后,用 PBS 洗涤细胞 3 次以去除未结合的 PI 染料,以 PBS 缓冲液重悬细胞调整细胞浓度为 10⁶ 细胞/mL,空气干燥固定在载玻片上,最后在荧光显微镜下进行观察。相同条件和操作过程下将 1×PBS 和氨苄青霉素 (20 μg/mL) 处理的细菌细胞作为对照组^[24-25]。

1.5.3 DLP4 的溶血性测定

取裸鼠新鲜全血加入抗凝管中,将血液于 1 000×g 离心 5 min,用生理盐水洗涤沉淀 5–6 次后收集红细胞,再用 1×PBS 配制成 4% 的红细胞溶液。在 6 个离心管中各加入 360 μL 上述稀释的红细胞,分别取 10 μL 不同浓度的抗菌肽溶液 (150、200、250、300 μg/mL) 与 90 μL 4% 红细胞溶液混合,37 °C 下孵育 30 min 后,将上述各混合液于 9 600×g 离心 5 min,取上清于紫外分光光度计测量在 540 nm 处的吸光值,用 1×PBS 和 1% Triton X-100 单独悬浮红细胞分别作为 0% 空白和 100% 溶血对照^[26-27]。

$$\text{溶血率计算公式为:溶血率(\%)} = \frac{Dt - Dnc}{Dpc - Dnc}$$

其中, Dt 是测定样品在 540 nm 处的吸光值, Dpc 与 Dnc 分别是阳性对照样品和阴性对

照样品在 540 nm 处的吸光值。

2 结果与分析

2.1 重组表达质粒的构建

为了构建表达质粒 pET-ELP-I-DLP4, 将 DLP4 的基因通过 PCR 扩增获得,琼脂糖凝胶电泳结果显示目的基因片段大小与理论长度相符,约为 136 bp (图 2A)。将 PCR 所得到的目的基因和 pET-ELP-I-CAT 表达载体分别用 *Bsr*G I 和 *Hind* III 进行酶切,载体酶切后可以检测到与理论值相符的两条条带 (图 2B)。将酶切后目的基因与 pET-ELP-I-CAT 表达载体进行连接构建 pET-ELP-I-DLP4 重组表达载体。通过酶切验证 (图 2C) 和测序,最终得到正确的重组表达质粒。

基于 split intein 的双 ELP 系统中重组表达质粒的构建如下。从构建的重组表达质粒 pET-ELP-I-DLP4 中扩增出 *intein* 基因的 N 端序列和 C 端序列,琼脂糖凝胶电泳结果显示目的基因片段大小与理论长度相符,约为 373 bp 和 202 bp (图 2D)。N 端片段经 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切,与相同酶切的表达载体 pET-ELP-I-DLP4 (图 2E,泳道 1) 连接;同样 C 端片段经 *Eco*R I 和 *Bsr*G I 双酶切,与相同酶切的表达载体 pET-ELP-I-DLP4 (图 2E,泳道 2) 连接,分别构建重组表达质粒 pET-ELP-I-O_N 和 pET-ELP-I-O_C-DLP4。菌液 PCR 验证 (图 2F) 表明得到正确的重组表达质粒。

2.2 重组蛋白的表达和纯化

2.2.1 抗菌肽 DLP4 的表达和纯化——ELP-Intein 系统

将构建成功的重组表达质粒 (pET-ELP-I-DLP4) 转化入 BL21(DE3) 菌株进行诱导表达,经 SDS-PAGE 可以观察到诱导后出现两条条带 (图 3B,泳道 2),其蛋白大小均在 66.2 kDa 附近,表明重组融合蛋白 ELP-I-DLP4 成功表达

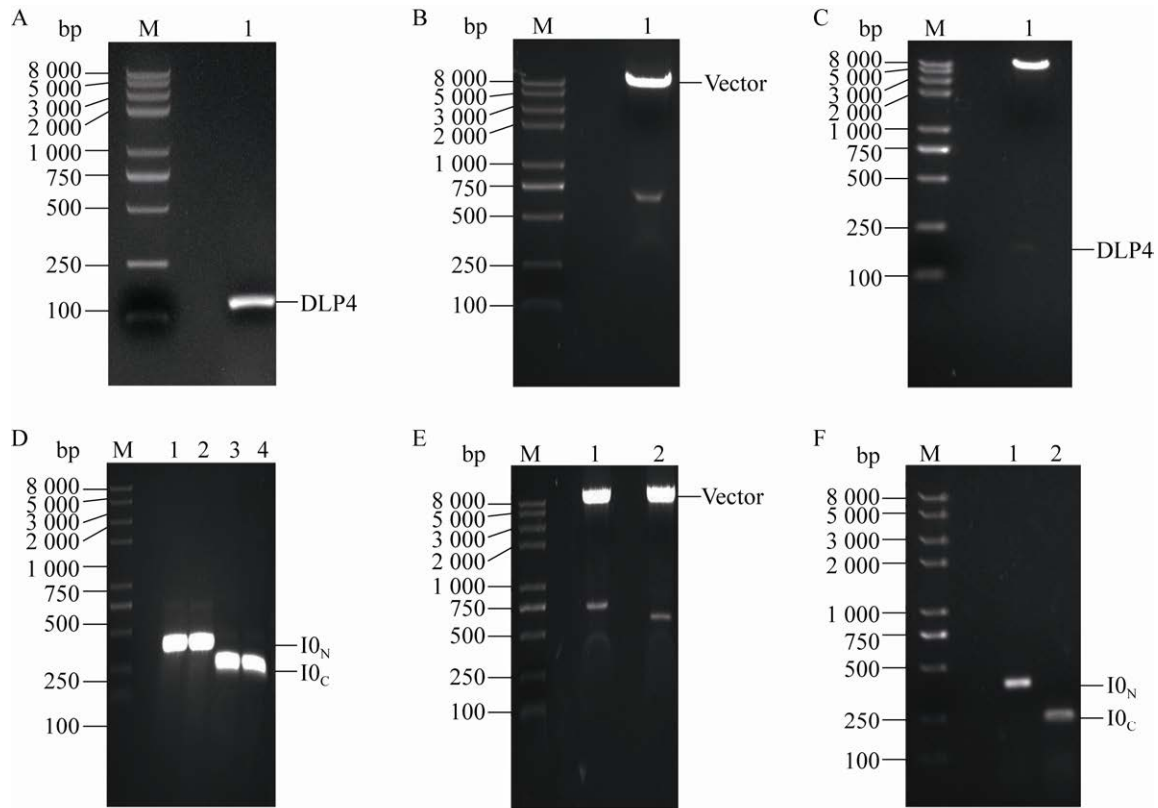


图 2 重组表达质粒的构建

Figure 2 Construction of recombinant expression plasmids. (A) Gel electrophoresis of PCR products. M: DNA marker; lane 1: PCR products of DLP4. (B) Double digestion of pET-ELP-I-CAT vector. M: DNA marker; lane 1: pET-ELP-I-CAT digested with *Hind* III and *Bsr*G I. (C) pET-ELP-I-DLP4 verified by double digestion. lane 1: pET-ELP-I-DLP4 digested with *Hind* III and *Bsr*G I. (D) Gel electrophoresis of PCR products. lane 1, 2: PCR products of the N-terminal sequence of intein gene ($I0_N$). lane 3, 4: PCR products of the C-terminal sequence of intein gene ($I0_C$). (E) Double digestion of the pET-ELP-I-DLP4 vector. lane 1: pET-ELP-I-DLP4 digested with *Eco*R I and *Hind* III; lane 2: pET-ELP-I-DLP4 digested with *Eco*R I and *Bsr*G I. (F) PCR detection of pET-ELP-I 0_N and pET-ELP-I 0_C -DLP4 bacterial culture. lane 1: PCR products of bacterial culture containing pET-ELP-I 0_N ; lane 2: PCR products of bacterial culture containing pET-ELP-I 0_C -DLP4.

但同时 intein 在细菌体内提前发生了 C 端断裂。将细菌裂解后，观察到重组蛋白几乎都溶解在上清中，说明表达的融合蛋白溶解性较好 (图 3B, 泳道 3 和 4)。在上清中加入终浓度为 0.4 mol/L 的硫酸铵，使融合蛋白沉淀 (图 3B, 泳道 5)。随后将沉淀用低 pH 断裂缓冲液进行溶解，室温过夜，从图中可以观察到发生断裂后的 EI 蛋白条带，表明 intein 成功发生了 C 端

断裂 (图 3B, 泳道 6)。当再次加入硫酸铵后，清楚地观察到有蛋白条带，说明成功去除带有 EI 标签的蛋白 (图 3B, 泳道 7)，经离心后，目的蛋白 DLP4 存在于上清液中。DLP4 分子量为 4.3 kDa，由于分子量太小而无法在 SDS-PAGE 胶图中观察到 (图 3B, 泳道 8)，于是通过 Tricine-SDS-PAGE 进行鉴定，在胶图上可以观察到 DLP4 蛋白条带 (图 3C)。通过 BCA

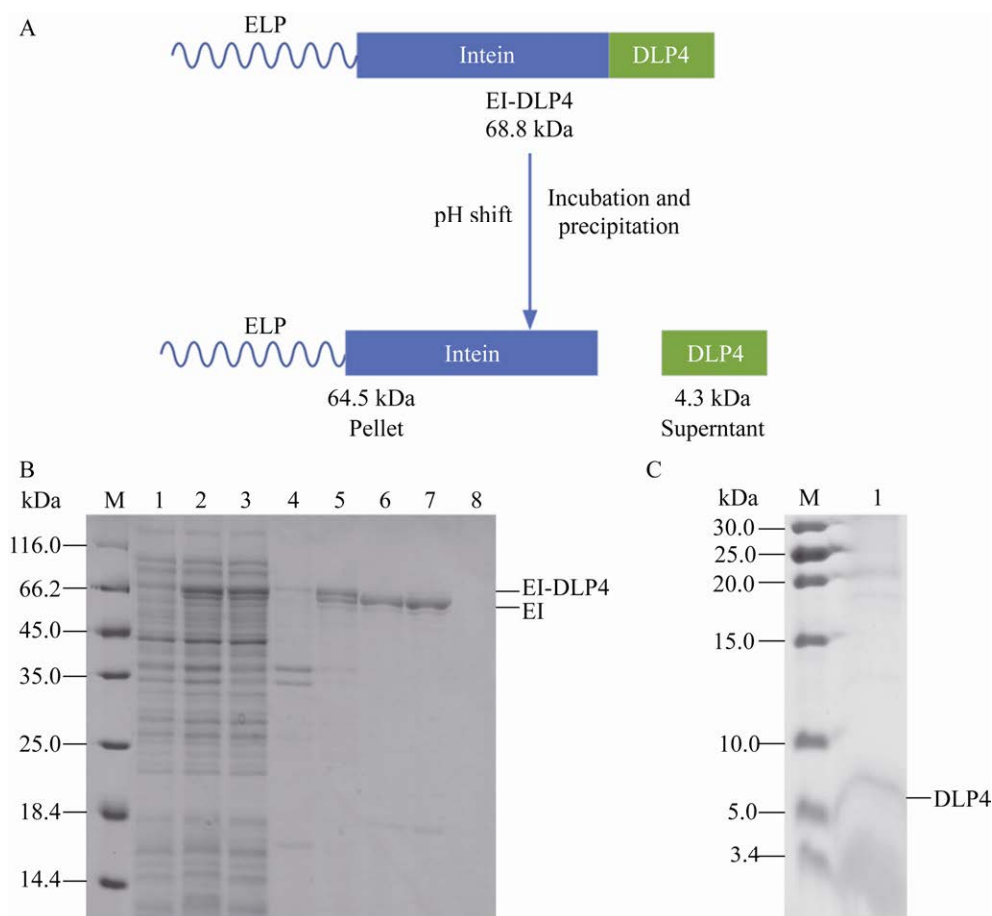


图3 重组蛋白表达和纯化

Figure 3 Recombinant protein expression and purification. (A) Schematic diagram of expression and purification of DLP4. (B) SDS-PAGE analysis of purification of the antimicrobial peptide DLP4 by the ELP-Intein system. M: protein marker. lane 1: total protein before induction; lane 2: total protein after IPTG induction; lane 3: supernatant of cell lysate; lane 4: precipitation of cell lysate; lane 5: precipitation of the first precipitation reaction; lane 6: supernatant after overnight intein self-cleavage; lane 7: precipitation of the second precipitation reaction; lane 8: supernatant from the second precipitation reaction. (C) Tricine-SDS-PAGE analysis of purified DLP4. lane 1: DLP4.

法对 DLP4 抗菌肽进行浓度测定后, 计算其得率约为 1.25 mg/L。

2.2.2 抗菌肽 DLP4 的表达和纯化——双 ELP-Intein 系统

为了解决上述蛋白质内含子在大肠杆菌内提前发生 C 端断裂的问题, 构建了基于 split intein 双 ELP 系统的 pET-ELP-I0_N 和 pET-ELP-I0_C-DLP4 两个重组表达质粒 (图 4A)。将构建成功的

N 端 (pET-ELP-I0_N) 和 C 端 (pET-ELP-I0_C-DLP4) 重组表达质粒分别转入 BL21(DE3) 菌株诱导表达, 经 SDS-PAGE 分析可以观察到, 诱导后在 45.0 kDa 和 66.2 kDa 之间新增蛋白条带 (图 4B, 泳道 2 和 3), 表明 N 端开关蛋白 (EI0_N) 和 C 端前体蛋白 (EI0_C-DLP4) 成功表达。将诱导表达后的包含前体蛋白 (EI0_C-DLP4) 与开关蛋白 (EI0_N) 的菌按照湿重 1 : 2 (W/W) 混合、破碎

后离心取上清和沉淀 (图 4B, 泳道 5 和 6), 重组蛋白几乎都溶解在上清中, 说明表达的前体蛋白与开关蛋白溶解性都较好。同样, 在上清中加入终浓度为 0.4 mol/L 的硫酸铵后, 在图中只观察到一条蛋白条带 (图 4B, 泳道 7), 这是因为 $EI0_C$ -DLP4 和 $EI0_N$ 融合蛋白大小相近。随后将沉淀用低 pH 断裂缓冲液溶解, 室温下过夜反应, 从胶图中可以观察到两条蛋白条带, 分别为 $EI0_C$ 蛋白和前体蛋白 $EI0_C$ -DLP4/ $EI0_N$ (图 4B, 泳道 8), 表明 intein 成功发生了

C 端断裂反应。当再次加入硫酸铵后, 结果表明断后产物 $EI0_C$ 和未反应的前体蛋白 $EI0_C$ -DLP4/ $EI0_N$ 被成功去除 (图 4B, 泳道 9), 离心后, 目的蛋白 DLP4 存在于上清液中。同样因为 DLP4 分子量小, 在 SDS-PAGE 胶图中无法观察到 (图 4B, 泳道 10), 于是通过 Tricine-SDS-PAGE 进行鉴定, 在胶图上可以观察到 DLP4 蛋白条带 (图 4C)。通过 BCA 法对 DLP4 抗菌肽进行浓度测定后, 计算其得率约为 1.49 mg/L。

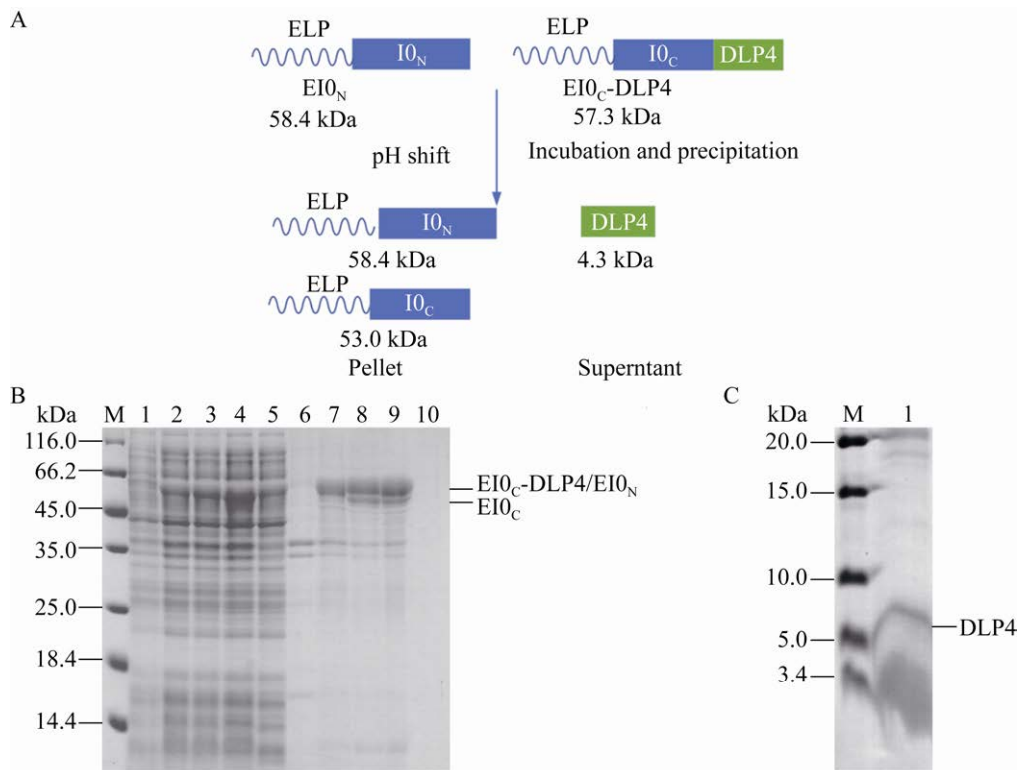


图 4 重组蛋白一步法表达和纯化

Figure 4 One-step expression and purification of recombinant protein. (A) Schematic diagram of expression and purification of recombinant protein. (B) SDS-PAGE analysis of purification of the antimicrobial peptide DLP4 by the double ELP-Intein system. M: protein marker. lane 1: total protein before induction; lane 2: total protein of switch protein $EI0_N$ after IPTG induction; lane 3: total protein of C-precursor protein $EI0_C$ -DLP4 after IPTG induction; lane 4: total protein mixture of switch protein and C-precursor protein after induction; lane 5: the supernatant of the bacterial cell lysates containing switch protein and C-precursor protein; lane 6: the precipitation of the bacterial cell lysates containing switch protein and C-precursor protein; lane 7: precipitation of the first precipitation reaction; lane 8: supernatant after overnight intein self-cleavage; lane 9: precipitation of the second precipitation reaction; lane 10: supernatant from the second precipitation reaction. (C) Tricine-SDS-PAGE analysis of purified DLP4. lane 1: DLP4.

2.3 DLP4 抗菌肽的抑菌活性测定

为了检测利用双 ELP-Intein 系统在大肠杆菌中生产的 DLP4 活性, 用 *S. aureus* 与 *B. subtilis* 作为指示菌, 打孔法测定抗菌肽的抑菌活性, 通过有无抑菌圈来判断 DLP4 的抑菌活性。依据先前文献中报道^[7,21], DLP4 对 *S. aureus* 与 *B. subtilis* 的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 分别为 0.01–2.34 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.02–0.04 $\mu\text{mol/L}$ 。从图中可以观察到纯化的 DLP4 对 *B. subtilis* 与 *S. aureus* 的抑菌圈直径分别约为 14 mm 和 12 mm (图 5), 说明经过原核表达纯化的 DLP4 具有抗菌活性。

2.4 DLP4 抗菌肽对细胞膜通透性的测定

荧光染料 PI 可以穿过破损的细胞膜从而嵌入双链 DNA 释放红色荧光, 但是不能穿透活细胞的细胞膜, 故可用作指示剂, 通过荧光显微镜观察评估 DLP4 对细胞膜的影响。以 1×PBS 处理的细胞作为阴性对照组, 氨苄青霉素处理的细胞为阳性对照组。图中可以观察到与阴性对照组相比, 经过 DLP4 处理的实验组细胞的红色荧光数量明显增加 (图 6A 和 6B), 说明通过

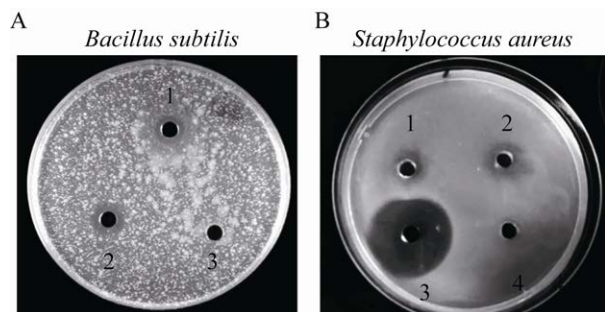


图 5 DLP4 的抑菌活性

Figure 5 Identification of the antimicrobial effect of DLP4 using disk diffusion assay. (A) Identification of antimicrobial activity of DLP4 against *B. subtilis*. 1: DLP4 (21 $\mu\text{mol/L}$); 2: 20 $\mu\text{g/mL}$ ampicillin; 3: 1×PBS. (B) Identification of antimicrobial activity of DLP4 against *S. aureus*. 1, 2: DLP4 (21 $\mu\text{mol/L}$); 3: 20 $\mu\text{g/mL}$ ampicillin; 4: 1×PBS.

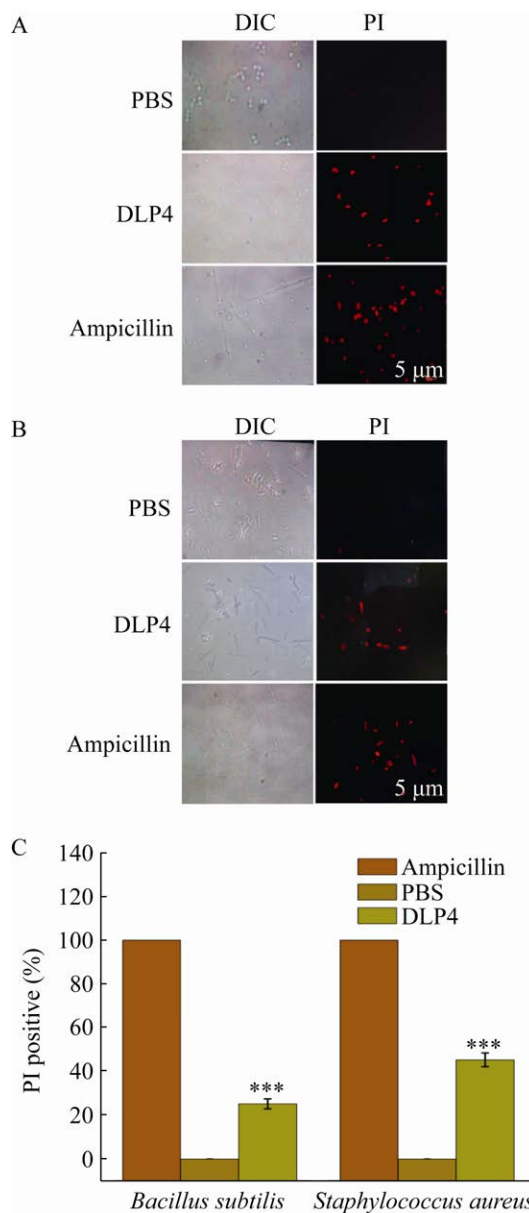


图 6 DLP4 对细胞膜通透性影响的测定

Figure 6 Detection of cell membrane permeability of DLP4. (A) PI staining of *Staphylococcus aureus* cells treated with 1×PBS, 20 $\mu\text{g/mL}$ ampicillin and DLP4 (21 $\mu\text{mol/L}$), respectively. (B) PI staining of *Bacillus subtilis* cells treated with 1×PBS, 20 $\mu\text{g/mL}$ ampicillin and DLP4 (21 $\mu\text{mol/L}$), respectively. (C) Percentage of *Staphylococcus aureus* cells and *Bacillus subtilis* cells stained with PI. Three duplicate observations were made, results were given as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). *** indicate statistically significant differences between samples at $P<0.001$.

ELP-Intein 系统在大肠杆菌中表达纯化的 DLP4 可能通过对细胞膜产生破坏作用而发挥抗菌活性。

2.5 DLP4 抗菌肽的溶血实验

为了检测纯化出的 DLP4 对哺乳动物细胞的细胞毒性。将具有浓度梯度的抗菌肽溶液与小鼠红细胞溶液进行混合处理,用 PBS 缓冲液和 1% Triton X-100 单独悬浮红细胞作为 0% (空白) 和 100% 溶血对照。如图 7 所示,当 DLP4 的浓度增加时,观察到溶血增加。当使用的抗菌肽浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$ 时,它对小鼠红细胞溶血率为 3.88%,即使浓度增加至 300 $\mu\text{g/mL}$ 时,溶血率也仅为 7.15%,显著低于阳性对照 (100%)。结果表明纯化的 DLP4 具有较低的红细胞溶血活性。

3 讨论与结论

DLP4 是一种两亲性阳离子昆虫防御素,来自黑水虻 (*Hermetia illucens*),其具有对革兰氏

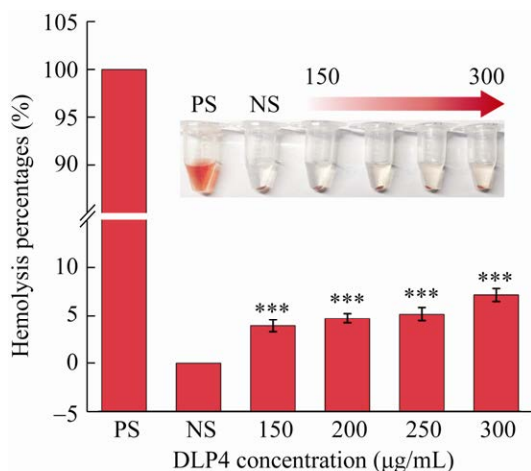


图 7 DLP4 抗菌肽的溶血实验

Figure 7 Hemolysis test of DLP4 antimicrobial peptide. PS: 1% Triton X-100; NS: PBS. Three duplicate observations were made, results were given as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). *** indicate statistically significant differences between samples at $P < 0.001$.

阳性菌表现出高效的抗菌活性,同时又表现出较低的溶血活性和细胞毒性,没有抗药性等特性。目前越来越多研究者已对 DLP4 进行了深入的研究,系统地评估了 DLP4 的结构、抗菌活性、毒性、耐药性和药效学^[2,7-8,28]。

由于 ELP-Intein 系统在蛋白质表达和纯化方面具有简单、经济等优点,目前过氧化氢酶、麦芽糖结合蛋白、氯霉素乙酰转移酶等多种蛋白,已经通过 ELP-Intein 系统进行表达纯化,并且具有较高的得率^[29],但是该系统在 AMPs 生产中的应用还很少^[16,22,30]。在本研究中,通过利用 ELP-Intein 系统的方法在大肠杆菌中实现 DLP4 的表达和纯化,而在先前研究中,DLP4 是在真核生物毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中进行诱导表达,产量可达 800 mg/L,但耗时、烦琐,且需要通过阳离子交换层析进行纯化抗菌肽^[7-8]。相比之下,ELP-Intein 系统以大肠杆菌作为宿主菌,大肠杆菌具有繁殖快、培养方便、操作简单、易于进行批量化生产等优点。另外,在后续蛋白纯化方面,基于 ELP 与 intein 相融合,利用 intein 的 C 端断裂与 ELP 标签特性,可以通过简单的离心和温度转变进行纯化,不需要昂贵的设备和烦琐过程,纯化工艺简单、成本低廉。在研究中使用该系统时,虽然 intein 的断裂效率接近 90% (图 3),但得率仅为 1.25 mg/L,这是由于 intein 在细菌体内表达过程中提前发生了 C 端断裂,从而导致大大地降低了目标蛋白的产量。为此,基于 split intein 的特性,进一步构建了基于 split intein 的 ELP 系统^[17,31]。研究结果表明,尽管基于 split intein 的 ELP 系统最终断裂效率相对于全长蛋白质内含子较低,约为 40% (图 4),但最终获得的 DLP4 得率为 1.49 mg/L,这是因为相对于 ELP-Intein 系统而言,基于 split intein 的 ELP 系统在体内可以得到更多的前体蛋白。目标蛋白的最终产量并

不高,可能是由于 ELP 标签分子量大以及 DLP4 的相对疏水性。多项研究表明,使用重复次数较少的 ELP 标签既可以达到同样的纯化效果,同时又可以提高抗菌肽的产量^[16,32]。我们后续将会对此进行研究,期望得到最适合抗菌肽表达和纯化的 ELP 长度,同时探索一步法的纯化条件,提高其断裂效率,从而提高 DLP4 的产量。

抗菌活性和细胞毒性是对纯化的抗菌肽初步筛选的重要指标。在先前研究中,菌落计数法以及抑菌圈实验表明,DLP4 对革兰氏阳性细菌具有高效的抗菌活性,对 *S. aureus* 与 *B. subtilis* 的最低抑菌浓度 MIC 分别为 0.01–2.34 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.02–0.04 $\mu\text{mol/L}$ ^[7-8,21]。本实验中,通过双 ELP-Intein 系统的方法在大肠杆菌中纯化的 DLP4 在含有 *S. aureus* 与 *B. subtilis* 的平板上形成了直径分别为 12 mm 和 14 mm 的抑菌圈(图 5),除此之外,基于对细胞膜破坏活性的实验研究,纯化的 DLP4 对 *S. aureus* 与 *B. subtilis* 的致死率分别为 45%和 25%(图 6),说明通过原核系统表达纯化出来的 DLP4 保持原有蛋白活性,对细胞会产生破坏作用,具有高效抗菌活性。在 DLP4 对细胞毒性的实验中,结果表明在高达 300 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下,DLP4 的溶血率为 7.15%(图 7),相比于先前对 DLP4 研究结果^[7],数值偏高,可能是在处理红细胞过程中,造成红细胞破裂,但相比于抗生素来说,纯化的 DLP4 依然表现出对真核细胞具有较低的毒性。

本文利用 ELP-Intein 系统在大肠杆菌中成功实现了 DLP4 的表达和纯化(图 3),并且对该系统进行了优化,构建了基于 split intein 的 ELP 系统,解决了原有 ELP-Intein 系统在大肠杆菌中提前发生 C 端断裂的问题。但是从图中观察到纯化出的 DLP4 蛋白条带的实际分子量超过理论分子量(4.3 kDa),其原因可能是小分子蛋白在电泳分离过程中存在漂移现象,在其

他抗菌肽研究中也有类似的现象报道^[7,21,30]。另外我们对纯化后的 DLP4 进行了抑菌活性以及细胞毒性的探究,结果表明其保持原有的抗菌活性(图 5)且细胞毒性较低(图 7),这些结果表明 ELP-Intein 系统可用于抗菌肽的生产,对抗菌肽 DLP4 新的生产方式进行了初步的探索。

REFERENCES

- [1] Meng D, Wu YH, Meng QL, et al. Antimicrobial resistance, virulence gene profile and molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows in Xinjiang province, northwest China. *J Glob Antimicrob Resist*, 2019, 16: 98-104.
- [2] Li B, Yang N, Wang XM, et al. An enhanced variant designed from DLP4 cationic peptide against *Staphylococcus aureus* CVCC 546. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1057.
- [3] Yin JB, Zhang XX, Wu B, et al. Metagenomic insights into tetracycline effects on microbial community and antibiotic resistance of mouse gut. *Ecotoxicology*, 2015, 24(10): 2125-2132.
- [4] Da Cunha NB, Cobacho NB, Viana JFC, et al. The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discov Today*, 2017, 22(2): 234-248.
- [5] Kang HK, Kim C, Seo CH, et al. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *J Microbiol*, 2017, 55(1): 1-12.
- [6] Wang S, Zeng XF, Yang Q, et al. Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): 603.
- [7] Li ZZ, Mao RY, Teng D, et al. Antibacterial and immunomodulatory activities of insect defensins-DLP2 and DLP4 against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 12124.
- [8] Ma XX, Yang N, Mao RY, et al. The pharmacodynamics study of insect defensin DLP4 against toxigenic *Staphylococcus hyicus* ACCC 61734 *in vitro* and *in vivo*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 638598.
- [9] Li JF, Zhang J, Song R, et al. Production of a cytotoxic cationic antibacterial peptide in *Escherichia coli* using SUMO fusion partner. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84(2): 383-388.

- [10] Fan YM, Miozzi JM, Stimple SD, et al. Column-free purification methods for recombinant proteins using self-cleaving aggregating tags. *Polymers*, 2018, 10(5): 468.
- [11] Van Roey P, Pereira B, Li Z, et al. Crystallographic and mutational studies of *Mycobacterium tuberculosis* recA mini-inteins suggest a pivotal role for a highly conserved aspartate residue. *J Mol Biol*, 2007, 367(1): 162-173.
- [12] Sarmiento C, Camarero JA. Biotechnological applications of protein splicing. *Curr Protein Pept Sci*, 2019, 20(5): 408-424.
- [13] Wood DW, Camarero JA. Intein applications: from protein purification and labeling to metabolic control methods. *J Biol Chem*, 2014, 289(21): 14512-14519.
- [14] Mullerpatan A, Chandra D, Kane E, et al. Purification of proteins using peptide-ELP based affinity precipitation. *J Biotechnol*, 2020, 309: 59-67.
- [15] Peddi S, Roberts SK, MacKay JA. Nanotoxicology of an elastin-like polypeptide rapamycin formulation for breast cancer. *Biomacromolecules*, 2020, 21(3): 1091-1102.
- [16] Sousa DA, Mulder KCL, Nobre KS, et al. Production of a polar fish antimicrobial peptide in *Escherichia coli* using an ELP-intein tag. *J Biotechnol*, 2016, 234: 83-89.
- [17] Fong BA, Wood DW. Expression and purification of ELP-intein-tagged target proteins in high cell density *E. coli* fermentation. *Microb Cell Fact*, 2010, 9: 77.
- [18] Fong BA, Wu WY, Wood DW. Optimization of ELP-intein mediated protein purification by salt substitution. *Protein Expr Purif*, 2009, 66(2): 198-202.
- [19] Li YF. Split-inteins and their bioapplications. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(11): 2121-2137.
- [20] Romero-Casañas A, Gordo V, Castro J, et al. Protein splicing: from the foundations to the development of biotechnological applications. *Methods Mol Biol*, 2020, 2133: 15-29.
- [21] Park SI, Kim JW, Yoe SM. Purification and characterization of a novel antibacterial peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Dev Comp Immunol*, 2015, 52(1): 98-106.
- [22] 郭丽, 刘化鑫, 林瑛. 利用ELP自断裂标签在大肠杆菌中生产抗菌肽 Oxysterlin 1. *生物工程学报*, 2021, 37(8): 2915-2923.
- Guo L, Liu HX, Lin Y. Production of antimicrobial peptide (oxysterlin 1) in *Escherichia coli* with ELP self-cleavage tag. *Chin J Biotech*, 2021, 37(8): 2915-2923 (in Chinese).
- [23] Bennett JV, Brodie JL, Benner EJ, et al. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl Microbiol*, 1966, 14(2): 170-177.
- [24] Kim JS, Jeong JH, Cho JH, et al. Antimicrobial activity of antimicrobial peptide LPcin-YK₃ derived from bovine lactophorin. *J Microbiol Biotechnol*, 2018, 28(8): 1299-1309.
- [25] Zheng XL, Wang XM, Teng D, et al. Mode of action of plectasin-derived peptides against gas gangrene-associated *Clostridium perfringens* type A. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0185215.
- [26] Eckhard LH, Hourri-Haddad Y, Sol A, et al. Sustained release of antibacterial lipopeptides from biodegradable polymers against oral pathogens. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0162537.
- [27] Horváti K, Bacsá B, Mlinkó T, et al. Comparative analysis of internalisation, haemolytic, cytotoxic and antibacterial effect of membrane-active cationic peptides: aspects of experimental setup. *Amino Acids*, 2017, 49(6): 1053-1067.
- [28] Li B, Yang N, Shan YX, et al. Therapeutic potential of a designed CS $\alpha\beta$ peptide ID13 in *Staphylococcus aureus*-induced endometritis of mice. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(15): 6693-6705.
- [29] Banki MR, Feng L, Wood DW. Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags. *Nat Methods*, 2005, 2(9): 659-661.
- [30] Shen Y, Ai HX, Song R, et al. Expression and purification of moricin CM4 and human β -defensins 4 in *Escherichia coli* using a new technology. *Microbiol Res*, 2010, 165(8): 713-718.
- [31] Shi CH, Meng Q, Wood DW. A dual ELP-tagged split intein system for non-chromatographic recombinant protein purification. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(2): 829-835.
- [32] Yang K, Su YJ, Li JH, et al. Expression and purification of the antimicrobial peptide cecropin AD by fusion with cationic elastin-like polypeptides. *Protein Expr Purif*, 2012, 85(2): 200-203.

(本文责编 陈宏宇)