

BmSPI38 同型串联多聚体在大肠杆菌中的表达和抗真菌活性

李游山^{1,2*}, 王圆¹, 朱瑞², 杨玺³, 魏梦¹, 张照锋¹, 陈长清⁴

1 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001

2 陕南秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心, 陕西 汉中 723001

3 陕西理工大学 秦巴生物资源与生态环境省部共建国家重点实验室(培育), 陕西 汉中 723001

4 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723001

李游山, 王圆, 朱瑞, 杨玺, 魏梦, 张照锋, 陈长清. BmSPI38 同型串联多聚体在大肠杆菌中的表达和抗真菌活性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 4275-4294.

LI Youshan, WANG Yuan, ZHU Rui, YANG Xi, WEI Meng, ZHANG Zhaofeng, CHEN Changqing. Expression of BmSPI38 tandem multimers in *Escherichia coli* and its antifungal activity[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 4275-4294.

摘要: 本研究旨在通过蛋白质工程手段获得结构均一性更好、活性更高、抗真菌能力更强的家蚕蛋白酶抑制剂 BmSPI38 的串联多聚体蛋白。利用原核表达技术获得 BmSPI38 串联多聚体蛋白, 并通过蛋白酶抑制剂胶内活性染色、蛋白酶抑制实验和真菌生长抑制实验等探讨串联多聚体化对 BmSPI38 的结构均一性、抑制活性和抗真菌能力的影响。活性染色结果表明, 基于多肽柔性接头的串联表达能够极大提高 BmSPI38 蛋白的结构均一性。蛋白酶抑制实验表明, 基于接头的串联三聚体化和四聚体化能提高 BmSPI38 对微生物蛋白酶的抑制能力。孢子萌发实验表明, His₆-SPI38L-tetramer 对球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)分生孢子萌发的抑制能力显著强于 His₆-SPI38-monomer。真菌生长抑制实验显示, 能够通过串联多聚体化来增强 BmSPI38 对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和白色念珠菌(*Candida albicans*)的抑制能力。本研究成功实现 BmSPI38 的串联多聚体在大肠杆菌中的异源活性表达, 并证实可通过串联多聚体化来增强 BmSPI38 的结构均一性和抗真菌能力, 不仅可为培育抗真菌转基因家蚕提供重要的理论依据和新策略, 还将推动 BmSPI38 的外源生产及在医疗领域的应用。

关键词: 家蚕; 蛋白酶抑制剂; 串联多聚体; 异源表达; 结构均一性; 抗真菌活性

资助项目: 国家自然科学基金(31702187); 陕西省自然科学基金基础研究计划重点项目(2022JZ-12); 陕西省教育厅重点科学研究计划项目(22JY017, 20JY007); 陕西理工大学科研项目(SLGKYXM2202)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31702187), the Key Project of Shaanxi Natural Science Basic Research Plan (2022JZ-12), the Key Scientific Research Project of Education Department of Shaanxi Province (22JY017, 20JY007), and the Scientific Research Foundation of Shaanxi University of Technology (SLGKYXM2202).

*Corresponding author. E-mail: li_youshan@126.com, li_youshan@sntu.edu.cn

Received: 2023-04-17; Accepted: 2023-07-03; Published online: 2023-07-06

Expression of BmSPI38 tandem multimers in *Escherichia coli* and its antifungal activity

LI Youshan^{1,2*}, WANG Yuan¹, ZHU Rui², YANG Xi³, WEI Meng¹, ZHANG Zhaofeng¹, CHEN Changqing⁴

1 College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, Shaanxi, China

2 Qinba Mountain Area Collaborative Innovation Center of Bioresources Comprehensive Development, Hanzhong 723001, Shaanxi, China

3 Qinba State Key Laboratory of Biological Resources and Ecological Environment (Incubation), Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, Shaanxi, China

4 Shaanxi Province Key Laboratory of Bio-resources, Hanzhong 723001, Shaanxi, China

Abstract: The aim of this study was to prepare tandem multimeric proteins of BmSPI38, a silkworm protease inhibitor, with better structural homogeneity, higher activity and stronger antifungal ability by protein engineering. The tandem multimeric proteins of BmSPI38 were prepared by prokaryotic expression technology. The effects of tandem multimerization on the structural homogeneity, inhibitory activity and antifungal ability of BmSPI38 were explored by in-gel activity staining of protease inhibitor, protease inhibition assays and fungal growth inhibition experiments. Activity staining showed that the tandem expression based on the peptide flexible linker greatly improved the structural homogeneity of BmSPI38 protein. Protease inhibition experiments showed that the tandem trimerization and tetramerization based on the linker improved the inhibitory ability of BmSPI38 to microbial proteases. Conidial germination assays showed that His₆-SPI38L-tetramer had stronger inhibition on conidial germination of *Beauveria bassiana* than that of His₆-SPI38-monomer. Fungal growth inhibition assay showed that the inhibitory ability of BmSPI38 against *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* could be enhanced by tandem multimerization. The present study successfully achieved the heterologous active expression of the silkworm protease inhibitor BmSPI38 in *Escherichia coli*, and confirmed that the structural homogeneity and antifungal ability of BmSPI38 could be enhanced by tandem multimerization. This study provides important theoretical basis and new strategies for cultivating antifungal transgenic silkworm. Moreover, it may promote the exogenous production of BmSPI38 and its application in the medical field.

Keywords: *Bombyx mori*; protease inhibitor; tandem multimer; heterologous expression; structural homogeneity; antifungal activity

家蚕(*Bombyx mori*)是一种具有巨大的经济价值的绢丝昆虫,有大量的基础研究积累,已成为昆虫生物化学、遗传学和基因组学的最佳模型之一^[1-4]。家蚕经过数千年人工驯化,尽管获得了适合群居饲养和发育整齐等有利于生产的特性,却也积累了易受病原微生物感染的不利性

状。昆虫致病性真菌,作为一种新型生物农药,已被广泛应用于农林害虫防治和蚊虫控制。真菌生物农药的使用,不可避免地会与家蚕发生交叉感染,引发高致病性蚕病,严重影响茧丝产量和质量,给整个桑蚕行业造成重大经济损失。因此阐明家蚕对真菌病害的防御机制,寻求新的防御

措施,创新家蚕遗传素材,对整个蚕业生产具有重要意义。

昆虫致病性真菌是通过机械压力及酶的降解的联合作用来穿透昆虫体壁的^[5-7]。许多昆虫致病性真菌都会分泌类枯草杆菌蛋白酶,即体壁降解蛋白酶。体壁降解蛋白酶是一种重要的毒力因子,通常在孢子萌发时分泌于昆虫体壁,并参与宿主表皮的穿透过程^[8-9]。过表达这些毒性蛋白酶,能够显著增强致病性真菌毒力^[10-12]。与哺乳动物不同,昆虫缺少淋巴细胞或免疫球蛋白,丝氨酸蛋白酶抑制剂被认为在昆虫免疫中起重要作用^[13-15]。前期的研究对免疫相关的家蚕蛋白酶抑制剂进行了系统鉴定,发现很多胰蛋白酶抑制剂样富含半胱氨酸的结构域(trypsin inhibitor-like cysteine-rich domain, TIL)类蛋白酶抑制剂在微生物添食感染后上调表达,暗示 TIL 类蛋白酶抑制剂可能参与家蚕的免疫过程^[16-17]。两个结构独特的 TIL 类蛋白酶抑制剂 BmSPI38 和 BmSPI39 能够通过抑制昆虫致病性真菌分泌的体壁降解蛋白酶 CDEP-1,来阻断 CDEP-1 诱导的有害黑化和抑制球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)的分生孢子萌发,进而增强家蚕的抗真菌能力^[18-19]。另有研究发现,很多蛋白酶抑制剂,特别是 TIL 类蛋白酶抑制剂,能够随吐丝过程进入茧层中,并通过抑制病原微生物分泌的外源蛋白酶活性来为茧内的蛹提供有效保护,表明该类抑制剂可作为抗真菌因子应用于医药和农业领域^[20-21]。

笔者前期的研究发现,重组表达的家蚕蛋白酶抑制剂 BmSPI38 易自发多聚化,形成二聚体、三聚体和四聚体^[22-23]。进一步研究发现, BmSPI38 在家蚕组织中主要以四聚体形式存在和发挥功能,而非单体形式^[23]。迄今为止, BmSPI38 的活性和功能已较为清楚,但多聚化对其抑制活性和抗真菌能力的影响仍不可知。此外,单个拷贝的 BmSPI38 基因在大肠杆菌中异

源表达的重组蛋白结构均一性很差,这也极大限制了其开发应用。能否通过蛋白质工程手段获得结构均一性更好、活性更高、抗真菌能力更强的 BmSPI38 串联多聚体蛋白亟待探索。

本研究拟构建 BmSPI38 同型串联多聚体的表达载体,利用原核表达技术获得重组多聚体蛋白,筛选结构均一性更好、活性更强的串联多聚体蛋白,并探讨多聚体化对其抑制活性和抗真菌能力的影响。该研究不仅有助于深化家蚕抗性因子 BmSPI38 作用机制的认识,为培育抗真菌转基因家蚕素材提供重要的理论依据和新策略,还将推动其外源生产及在医疗领域的开发和应用。

1 材料与方 法

1.1 供试真菌、大肠杆菌和试剂

TransStart[®] *TopTaq* DNA 聚合酶购自北京全式金生物技术股份有限公司。*Nde* I、*Not* I、*Bam*H I、*Bgl* II 内切酶购自 TaKaRa 公司。林伯氏白色念球菌(*Tritirachium album limber*)的蛋白酶 K 购自 Roche 公司。地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的枯草杆菌蛋白酶 A、N-乙酰基-D,L-苯丙氨酸-β-萘酯(N-acetyl-D,L-phenylalanine-β-naphthylester)、Fast Blue B Salt 等购自 Sigma 公司。FITC-酪蛋白购自 Thermo Fisher Scientific 公司。p28 质粒(由 pET28b 删减部分多克隆位点衍生而来表达质粒)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) Origami 2(DE3)菌株、球孢白僵菌、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和白色念珠菌(*Candida albicans*)均由陕西理工大学生物科学与工程学院保存。

1.2 基础单元载体的构建

以前期构建的 *BmSPI38*-p28 质粒为模板, *BmSPI38*-*Nde* I-*Bam*H I-F 为上游引物,再分别以 *BmSPI38*-*Not* I-R、*BmSPI38*-*Bgl* II-R、*BmSPI38*-*L*-*Bgl* II-R 为下游引物进行 PCR 扩增(表 1)。扩增

程序为:94 °C预变性 3 min;94 °C变性 30 s,58 °C退火 30 s,72 °C延伸 30 s,共 30 个循环;72 °C再延伸 10 min。利用 1.5%琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测。将胶回收的目的片段 *Nde* I/*Bam*H I-*SPI38-Not* I (207 bp)、*Nde* I/*Bam*H I-*SPI38-Bgl* II (200 bp)和 *Nde* I/*Bam*H I-*SPI38L-Bgl* II (245 bp)分别连接至 pEASY-T1-simple 载体(北京全式金生物技术股份有限公司),转化 Trans-T1 感受态细胞(北京全式金生物技术股份有限公司),利用菌液 PCR 技术筛选阳性克隆,最后测序验证。选择测序正确的克隆,提取质粒,分别命名为基础单元载体 *Nde* I/*Bam*H I-*SPI38-Not* I-TA (4 036 bp)、*Nde* I/*Bam*H I-*SPI38-Bgl* II-TA (4 029 bp)和 *Nde* I/*Bam*H I-*SPI38L-Bgl* II-TA (4 074 bp)。

1.3 BmSPI38 串联多聚体的表达载体构建

利用 *Nde* I 和 *Not* I 对 *Nde* I/*Bam*H I-*SPI38-Not* I-TA 质粒和 p28 表达载体进行双酶切,在 T4 DNA 连接酶(TaKaRa 公司)作用下构建 *Nde* I/*Bam*H I-*SPI38-Not* I-p28 质粒,命名为 His₆-SPI38-monomer 表达载体。*Bam*H I (G/GATCC)和 *Bgl* II (A/GATCT)是一对同尾酶。使用 *Nde* I、*Bgl* II 对基础单元载体 *Nde* I/*Bam*H I-*SPI38Bgl* II-TA, *Nde* I/*Bam*H I-*SPI38L-Bgl* II-TA 进行双酶切,再使用 *Nde* I 和 *Bam*H I 对构建成功的 His₆-SPI38-monomer 表达载体进行双酶切。分别将酶切回收后的 *Nde* I/*Bam*H I-*SPI38-Bgl* II

片段和 *Nde* I/*Bam*H I-*SPI38L-Bgl* II 片段与 His₆-SPI38-monomer 载体片段连接,获得两种形式的串联二聚体表达载体 His₆-SPI38-dimer 和 His₆-SPI38L-dimer。同理,利用同尾酶法在二聚体表达质粒的基础上,连入 *Nde* I/*Bam*H I-*SPI38-Bgl* II, *Nde* I/*Bam*H I-*SPI38L-Bgl* II 片段,构建同型三聚体表达质粒(His₆-SPI38-trimer 和 His₆-SPI38L-trimer);在同型三聚体表达质粒的基础之上构建四聚体表达质粒(His₆-SPI38-tetramer 和 His₆-SPI38L-tetramer)。使用限制性核酸内切酶 *Nde* I、*Not* I 内切酶,对构建成功的 BmSPI38 同型串联多聚体表达质粒进行双酶切验证,并送公司进行测序验证。

1.4 蛋白表达和纯化

将构建成功的 BmSPI38 同型串联多聚体表达质粒转化大肠杆菌 Origami 2(DE3)菌株。在 37 °C、220 r/min 条件下培养至菌体 OD₆₀₀ 为 0.6–1.0 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.1、0.05 或 0.02 mmol/L,于 16 °C 下诱导表达 20 h。6 000 r/min 离心 30 min 收集菌体,用结合缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl,500 mmol/L NaCl,pH 7.9)重悬菌体。经过超声破碎、离心,收集菌体上清,然后采用 16.5% SDS-PAGE 进行电泳分离,最后利用考马斯亮蓝进行染色。融合表达的 BmSPI38 串联多聚体蛋白的 N 末端连有一个多聚组氨酸标签(MGHHHHHHMGGGS)。利用 Ni²⁺-NTA [生工生物工程(上海)股份有限公司]亲和层析法对重组

表 1 基础单元载体构建所需引物

Table 1 Primers required for vector construction of the basic units

Primers	Sequence (5'→3')
<i>BmSPI38-Nde</i> I- <i>Bam</i> H I-F	CGCCATATGGGCGGATCCACCGAATATGGATGCCCTGAA
<i>BmSPI38-Not</i> I-R	ATTGCGGCCGCTCAGCAATCAGAAATGGGCAC
<i>BmSPI38-Bgl</i> II-R	GAAGATCTGCAATCAGAAATGGGCACACAT
<i>BmSPI38-L-Bgl</i> II-R	GAAGATCTTGAGCCACCACCGCCTGAGCCACCACCGCCTGAGCCACCA CCGCCGCAATCAGAAATGGGCACACAT

Nde I (CA/TATG), *Bam*H I (G/GATCC), *Not* I (GC/GGCCGC) and *Bgl* II (A/GATCT) restriction sites are shown in bold. The coding sequence of the fusion protein linker (L) are underlined.

蛋白进行纯化。含有重组蛋白的菌体上清经 0.45 μm 滤膜过滤后上 1 mL 柱, 流速控制在 0.5–1.0 mL/min。使用含有 0、20、50、100、400 mmol/L 咪唑的结合缓冲液依次进行漂洗和洗脱。根据 16.5% 的 SDS-PAGE 的检测结果, 收集高度富集目的蛋白的洗脱部分, 透析至结合缓冲液后, 进行第二轮镍离子螯合亲和层析。经电泳检测后最终收集不同形式的串联多聚体纯蛋白, 透析至 20 mmol/L 的 PBS 缓冲液(pH 7.8)中保存。

1.5 蛋白酶抑制剂的胶内活性染色

将诱导表达的蛋白样品与 4×Native PAGE 上样缓冲液(40 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 40% 甘油, 0.032% 溴酚蓝)混合后, 利用 10% Native PAGE 进行分离, 然后进行胶内活性染色。蛋白酶抑制剂的胶内活性染色可参照前期报道的方法^[18,24]。将电泳后的凝胶置于蛋白酶溶液中, 于 37 °C、45 r/min 避光振荡孵育 30 min。回收蛋白酶溶液, 用 ddH₂O 清洗胶面, 然后 37 °C 避光静置 30 min。按照 1:10 的体积比加入基质液(200 mg N-乙酰基-D,L-苯丙氨酸- β -萘酯溶于 100 mL N,N'-二甲基甲酰胺)和染色液(100 mg Fast Blue B Salt 溶于 100 mL 含 20 mmol/L CaCl₂ pH 8.0 的 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液)的混合液, 37 °C、45 r/min 避光孵育 15 min。弃掉染色液, 加入 ddH₂O 清洗胶面以终止反应。染色原理如下: 凝胶上的蛋白酶可分解生色底物 N-乙酰基-D,L-苯丙氨酸- β -萘酯, 生成的 β -萘酚通过重氮偶合反应将胶染成紫红色^[25-26]。胶内蛋白酶抑制剂若能抑制相应的蛋白酶活性, 其所在位置将不会被染色, 而呈现为白色条带。

1.6 蛋白酶抑制实验

根据蛋白酶抑制剂分子中 TIL 结构域的物质质量, 将 BmSPI38 串联多聚体蛋白的物质质量换算成 TIL 结构域的物质质量。例如 1 mol His₆-SPI38-dimer 或 His₆-SPI38L-dimer 蛋白具有

2 mol TIL 结构域。取 0.003 nmol 的枯草杆菌蛋白酶(分子量为 27 kDa)或蛋白酶 K (分子量为 28.8 kDa)与蛋白酶抑制剂混合后, 补充缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L CaCl₂, pH 8.0)至 100 μL , 37 °C 孵育 30 min。抑制剂的 TIL 结构域与蛋白酶的摩尔比设置为 0.5、1、2、5、10 和 15。然后, 加入 100 μL FITC-酪蛋白, 37 °C 避光孵育 60 min。于 485 nm 激发/528 nm 发射波长下, 测定其荧光强度, 计算剩余酶活。对照组以等体积的 PBS 缓冲液(pH 7.8)替代蛋白酶抑制剂。通过以下公式来评估蛋白酶抑制剂对蛋白酶的抑制活性: 剩余酶活%=实验组酶活/对照组酶活 \times 100%。

1.7 球孢白僵菌分生孢子萌发实验

将球孢白僵菌接种于马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)固体培养基, 28 °C 培养 10 d 后, 收集孢子。经无菌脱脂棉过滤除去菌丝。利用灭菌 ddH₂O 配制 9×10^7 孢子/mL 的球孢白僵菌分生孢子悬液。将 200 μL 马铃薯葡萄糖液体(potato dextrose liquid, PDL)培养基与 100 μL 具有 0.03 nmol/ μL TIL 结构域的蛋白酶抑制剂混匀后, 加入 100 μL 分生孢子悬液, 于 28 °C、80 r/min 振荡培养 4、8 h 和 12 h。以等体积的 20 mmol/L PBS (pH 7.8)处理作为对照。取培养不同时间后的孢子进行显微观察, 计算孢子萌发率。当分子孢子的萌芽管长度大于等于其宽度时, 则被认定为已经萌发。所有实验均重复 3 次。孢子萌发率%=萌发孢子数/总孢子数 \times 100%。

1.8 真菌生长抑制实验

将过夜培养的白色念珠菌或酿酒酵母按 1:1 000 比例接种于 PDL 培养基中, 于 28 °C、100 r/min 培养 24 h。利用无菌脱脂棉过滤菌液, 4 °C、4 000 \times g 离心 20 min 收集孢子。经细胞计数后, 利用无菌 ddH₂O 配制 1×10^5 个/mL 的孢子悬液。取 160 μL 菌液、160 μL 培养基与 160 μL

具有 0.01 nmol/ μ L TIL 结构域的蛋白酶抑制剂于 2.0 mL 离心管中混匀。以 20 mmol/L PBS 为阴性对照, 以 100 mmol/L EDTA 为阳性对照, 将混合液在 28 $^{\circ}$ C、100 r/min 条件下振荡培养。培养 0、12、24、36、48 h 后, 取 100 μ L 培养物至 96 孔板中, 测定 600 nm 处的吸光度, 并绘制真菌生长动力学曲线图。所有试验均重复 3 次。按照以下公式计算真菌生长抑制率: 抑制率%=(1- $OD_{600\text{exp}}$ / $OD_{600\text{pbs}}$) \times 100%。

1.9 统计学分析

利用 DPS 数据处理系统软件 9.01 版本对蛋白酶抑制试验、孢子萌发试验和真菌生长抑制试验进行统计学分析。采用单因素试验的方差分析[最小显著性差异法(least-significant difference, LSD)]对统计学显著性差异进行评估。误差棒表示平均值的标准偏差($n=3$)。标有不同字母“a-e”表示处理组间差异显著($P<0.05$), 标有一个相同字母表示处理组间差异不显著($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 BmSPI38 串联多聚体表达载体的设计与构建

为了获得有活性的 BmSPI38 同型串联多聚体蛋白, 共设计了两套表达载体的构建策略(图 1A): 第一套策略在融合蛋白间不添加接头(linker)序列; 第二套策略在融合蛋白间添加接头序列。接头序列是 2 个融合蛋白间起连接作用的氨基酸链, 具有一定的柔性, 有助于蛋白表达过程中的正确折叠, 以允许两侧的蛋白完成各自独立的功能^[27-28]。富含甘氨酸的接头如(GGGGS) n 是连接融合蛋白不同部分最常用的接头序列。这里采用的接头序列为“GGGGSGGGSGGGGS”, 其对应的编码序列为“GGCGGTGGTGGCTCAGCGGTGGTGGCTCAGGCGGTGGTGGCTCA”。首先构建基础单元载体 *Nde* I/*Bam*H I-SPI38-

Not I-TA、*Nde* I/*Bam*H I-SPI38-*Bgl* II-TA 和 *Nde* I/*Bam*H I-SPI38L-*Bgl* II-TA; 然后利用双酶切法将基因片段“*Nde* I/*Bam*H I-SPI38-*Not* I”连入 p28 表达载体, 构建 His₆-SPI38-monomer 表达载体; 接着, 利用同尾酶法分别将基因片段“*Nde* I/*Bam*H I-SPI38-*Bgl* II”和“*Nde* I/*Bam*H I-SPI38L-*Bgl* II”插入质粒 His₆-SPI38-monomer 中的 *Nde* I/*Bam*H I 位点, 得到重组质粒 His₆-SPI38-dimer 和 His₆-SPI38L-dimer; 最后, 利用同尾酶法依次构建同型三聚体表达质粒(His₆-SPI38-trimer 和 His₆-SPI38L-trimer)和四聚体表达质粒(His₆-SPI38-tetramer 和 His₆-SPI38L-tetramer)。

为了获得 *Nde* I/*Bam*H I-SPI38-*Not* I (207 bp)、*Nde* I/*Bam*H I-SPI38-*Bgl* II (200 bp) 与 *Nde* I/*Bam*H I-SPI38L-*Bgl* II (245 bp) 基因片段, 分别利用表 1 中所述引物进行 PCR 扩增, 并对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测(图 1B)。电泳结果显示, 在预期大小位置出现 3 条信号较强的目的条带。将上述 3 个基因片段分别克隆至 pEASY-T1-simple 质粒中, 利用菌液 PCR 技术筛选阳性克隆, 并送公司测序。测序结果表明, 基础单元载体 *Nde* I/*Bam*H I-SPI38-*Not* I-TA (4 036 bp)、*Nde* I/*Bam*H I-SPI38-*Bgl* II-TA (4 029 bp)、*Nde* I/*Bam*H I-SPI38L-*Bgl* II-TA (4 074 bp) 构建成功。

参照 1.3 方法构建 BmSPI38 串联多聚体的表达载体。在重组表达载体 His₆-SPI38-monomer、His₆-SPI38-dimer、His₆-SPI38-trimer、His₆-SPI38-tetramer、His₆-SPI38L-dimer、His₆-SPI38L-trimer 和 His₆-SPI38L-tetramer 的 *Nde* I/*Not* I 的双酶切产物中分别检测到 196、376、556、736、421、646、871 bp 的 DNA 片段(图 1C), 与预期大小一致。最后经测序验证, 上述 7 个重组表达载体构建成功。

2.2 BmSPI38 串联多聚体的蛋白活性表达及结构均一性分析

为了获得具有活性的 BmSPI38 串联多聚体蛋白, 将构建好的 BmSPI38 串联多聚体表达质粒转入 Origami 2(DE3) 菌株中, 并以工作浓度为 0.1、0.05 或 0.02 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达。最后, 利用 16.5% SDS-PAGE 对大肠杆菌中异源表达的 BmSPI38 串联多聚体蛋白进行分离检测(图 2A-2C)。His₆-SPI38-monomer、His₆-SPI38-dimer、

His₆-SPI38-trimer 和 His₆-SPI38-tetramer 蛋白的理论分子量分别为 7 709.54、14 300.86、20 892.18、27 483.50 Da。His₆-SPI38L-dimer、His₆-SPI38L-trimer、His₆-SPI38L-tetramer 蛋白的理论分子量分别为 15 246.71、22 783.89、30 321.07 Da。结果表明, 在 3 种不同浓度的 IPTG 诱导下, BmSPI38 串联多聚体的蛋白均主要以包涵体形式表达; 在 0.05 mmol/L 浓度 IPTG 诱导下, His₆-SPI38-monomer 在菌体裂解物上清中也检测到

A



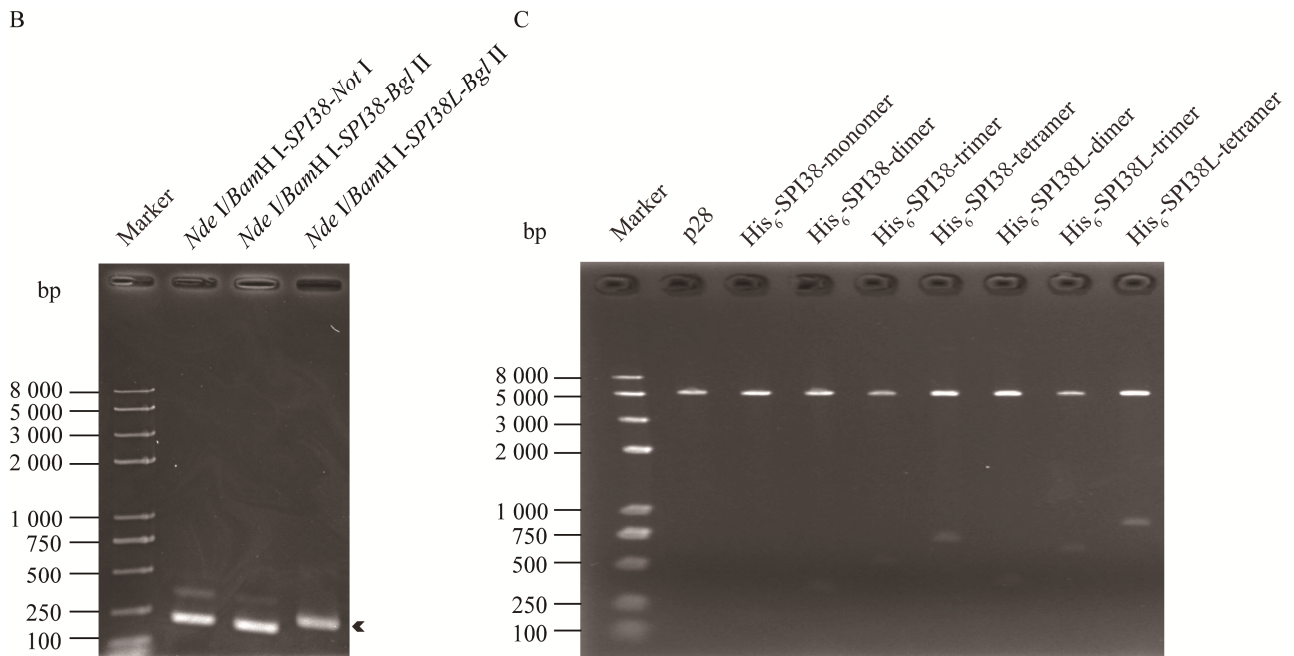


图1 *BmSPI38* 串联多聚体表达载体的设计与构建

Figure 1 Design and construction of expression vector of *BmSPI38* tandem multimers. A: Schematic diagram of expression vector construction of *BmSPI38* tandem multimers. Glycine-rich flexible linker was used to connect protein modules. “*SPI38*” represents the coding sequence of *BmSPI38* protein module, and “*SPI38L*” represents the coding sequence of *BmSPI38* protein module connected by flexible linker. The amino acid sequence and the coding sequence of the linker are “GGGGSGGGSGGGGS” and “GGCGGTGGTGGCTCAGGCGGTGGTGGCTCAGGCGGTGGTGGCTCA”, respectively. *BamH* I (G/GATCC) and *Bgl* II (A/GATCT) are a pair of isocaudamer. B: Agarose gel electrophoresis detection of PCR products of basic unit fragments. Target products of the PCR are indicated by arrows. C: Double digestion of recombinant expression vector using *Nde* I/*Not* I. p28 is a derivative expression plasmid of pET28b. The bands of about 5 000 bp are linearized vector fragments produced by double digestion.

较高水平的表达。尽管菌体上清中没有检测到 His₆-SPI38-dimer、His₆-SPI38-trimer、His₆-SPI38-tetramer、His₆-SPI38L-dimer、His₆-SPI38L-trimer 和 His₆-SPI38L-tetramer 高水平表达，但不排除它们在大肠杆菌中以可溶形式较低水平表达的可能。

为了进一步探究家蚕蛋白酶抑制剂 *BmSPI38* 的串联多聚体能否在大肠杆菌中的异

源活性表达，利用蛋白酶抑制剂胶内活性染色技术对菌体裂解物上清中的 *BmSPI38* 串联多聚体蛋白进行分析(图 2D–2F)。活性染色结果表明，0.1、0.05 或 0.02 mmol/L 的 IPTG 诱导表达的菌体上清中均检测到 His₆-SPI38-monomer、His₆-SPI38-dimer、His₆-SPI38-trimer、His₆-SPI38-tetramer、His₆-SPI38L-dimer、His₆-SPI38L-trimer 和 His₆-SPI38L-tetramer 对枯草杆菌蛋白酶的抑

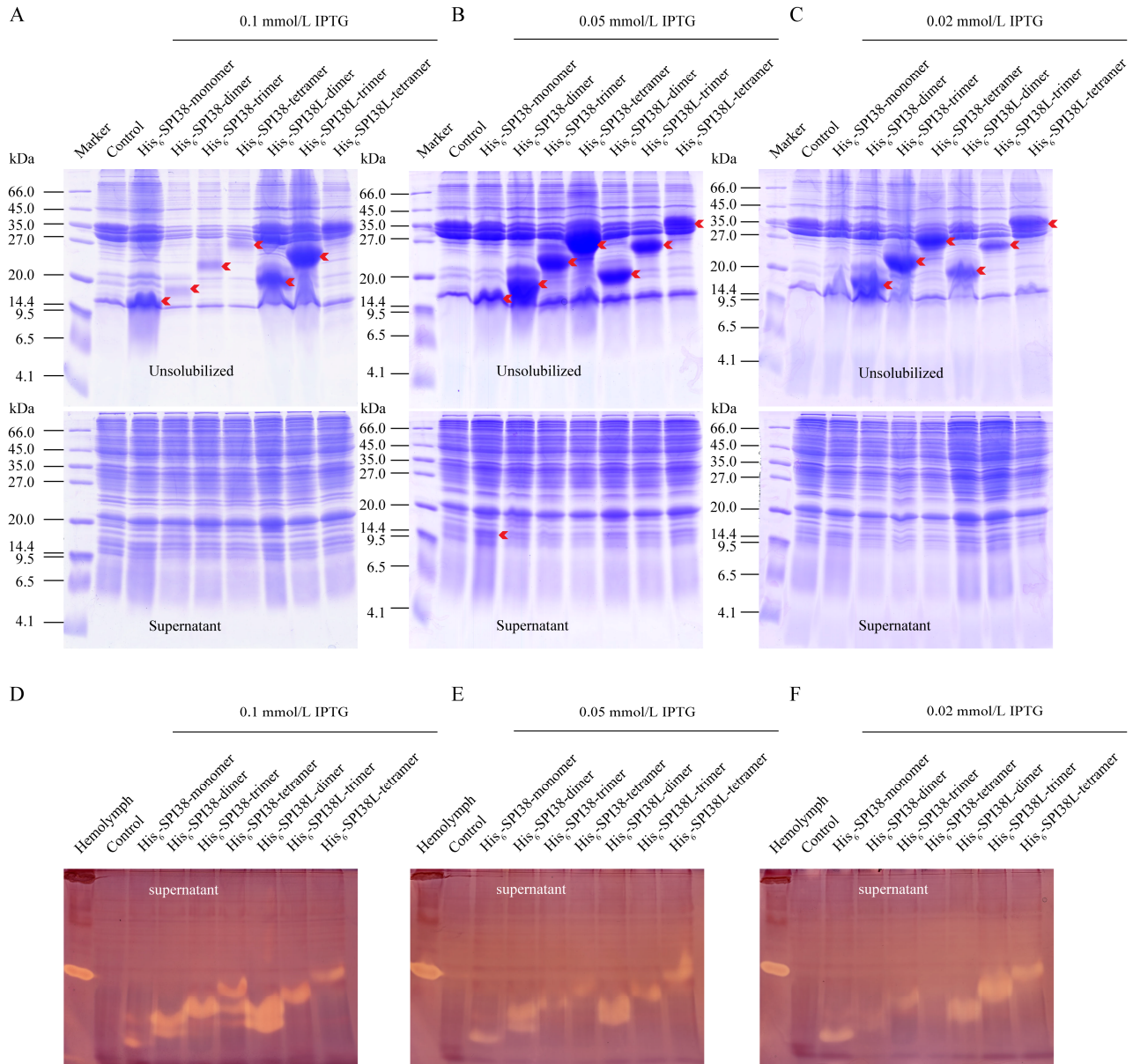


图2 BmSPI38 串联多聚体的蛋白表达及结构均一性分析

Figure 2 Protein expression and structural homogeneity analysis of BmSPI38 tandem multimers. SDS-PAGE analysis of BmSPI38 tandem multimers induced by (A) 0.1 mmol/L, (B) 0.05 mmol/L and (C) 0.02 mmol/L IPTG. The *Escherichia coli* cells containing the p28 empty vector induced by the same final concentration of IPTG were used as control. The “supernatant” and “unsolubilized” indicate the supernatant and unsolubilized part of the *E. coli* lysate, respectively. Arrows represent the fusion proteins of BmSPI38 tandem multimers. In-gel activity staining of BmSPI38 tandem multimers induced by (D) 0.1 mmol/L, (E) 0.05 mmol/L and (F) 0.02 mmol/L IPTG. The supernatant of *E. coli* cells transformed with p28 plasmid was used as a negative control. The hemolymph of the fifth instar larvae of the silkworm contains a variety of protease inhibitors, so it can be used as a positive control to detect whether the in-gel activity staining of protease inhibitor is successful.

制活性带。重组表达的各种串联体蛋白对应的抑制活性条带随着串联单元数增加而呈阶梯状分布。整体而言, 0.1 mmol/L IPTG 诱导组中 BmSPI38 的串联多聚体的抑制活性带要强于 0.05、0.02 mmol/L IPTG 诱导组。需要指出的是, 单拷贝 BmSPI38 基因在大肠杆菌中异源表达的重组蛋白结构均一性较差, 至少存在 3 条抑制活性条带^[23]。不添加接头序列的串联多聚体形式 (His₆-SPI38-monomer、His₆-SPI38-dimer、His₆-SPI38-trimer 和 His₆-SPI38-tetramer) 均检测到 2 条以上的抑制活性带(图 2D、2E), 而添加接头序列的串联多聚体形式 (His₆-SPI38L-dimer、His₆-SPI38L-trimer 和 His₆-SPI38L-tetramer) 只检测到一条抑制活性条带(图 2D-2F), 表明基于柔性接头的串联多聚体化可提高 BmSPI38 的结构均一性。

2.3 BmSPI38 串联多聚体的纯化

为了获得 BmSPI38 串联多聚体的纯蛋白, 对携有重组表达载体的 Origami 2(DE3) 进行扩大培养和诱导表达, 并利用镍离子螯合亲和层析法纯化目的蛋白。经第一轮镍柱亲和层析后, BmSPI38 串联多聚体的 SDS-PAGE 结果表明(图 3A-3G), 含 50-400 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液可将目的蛋白 His₆-SPI38-monomer、His₆-SPI38-dimer、His₆-SPI38-trimer、His₆-SPI38-tetramer、His₆-SPI38L-dimer、His₆-SPI38L-trimer 和 His₆-SPI38L-tetramer 洗脱下来, 但尚有较多杂蛋白。除了检测到 His₆-SPI38-monomer 的单体形式(7 709.54 Da) 之外, 还检测到其分子间寡聚化形成的二聚体形式(15 419.08 Da)、His₆-SPI38-dimer (14 300.86 Da)、His₆-SPI38-trimer (20 892.18 Da)、His₆-SPI38-tetramer (27 483.50 Da)、His₆-SPI38L-dimer (15 246.71 Da)、His₆-SPI38L-trimer (22 783.89 Da) 和 His₆-SPI38L-tetramer (30 321.07 Da) 的预期大小位置均检测到两条靠得很近的蛋白

条带, 这可能与二硫键桥还原不充分引起的蛋白酶抑制剂分子内的二硫键异常形成有关^[23]。收集合并 50、100、400 mmol/L 咪唑的洗脱产物, 透析除咪唑后, 再次进行镍柱亲和层析。SDS-PAGE 结果表明, 经两轮亲和层析后的 BmSPI38 串联多聚体蛋白的纯度较高, 可用于后续实验(图 3H)。

2.4 BmSPI38 串联多聚体对微生物蛋白酶抑制能力的比较

为了进一步探究串联多聚体化对 BmSPI38 活性的影响, 选取枯草杆菌蛋白酶和蛋白酶 K 进行蛋白酶抑制活性测定。在 TIL 结构域摩尔当量相同的条件下, 测定 7 种形式的抑制剂处理蛋白酶后的剩余酶活。就枯草杆菌蛋白酶的抑制能力而言, His₆-SPI38L-trimer >> His₆-SPI38L-tetramer 和 His₆-SPI38-monomer > His₆-SPI38L-dimer 和 His₆-SPI38-trimer > His₆-SPI38-dimer 和 His₆-SPI38-tetramer (图 4A、4B)。His₆-SPI38-monomer 对蛋白酶 K 的抑制能力强于 His₆-SPI38-dimer、His₆-SPI38-trimer、His₆-SPI38-tetramer 和 His₆-SPI38L-dimer, 却显著弱于 His₆-SPI38L-trimer 和 His₆-SPI38L-tetramer (图 4C、4D)。His₆-SPI38-monomer、His₆-SPI38-dimer、His₆-SPI38-trimer、His₆-SPI38-tetramer、His₆-SPI38L-dimer、His₆-SPI38L-trimer 和 His₆-SPI38L-tetramer 中的 TIL 结构域对枯草杆菌蛋白酶的 IC₅₀ 分别是 77.38、140.07、104.78、108.07、101.43、48.52 nmol/L 和 78.20 nmol/L (表 2)。它们的 TIL 结构域对蛋白酶 K 的 IC₅₀ 分别是 123.84、254.43、252.48、235.37、199.96、84.64、112.36 nmol/L。总体而言, His₆-SPI38L-trimer 对枯草杆菌蛋白酶和蛋白酶 K 的抑制活性最强。上述结果表明, 串联多聚体化能够影响 BmSPI38 对微生物蛋白酶的抑制活性, 基于多肽柔性接头的串联三聚化和四聚体化能够极大提高 BmSPI38 对微生物蛋白酶的抑制能力。

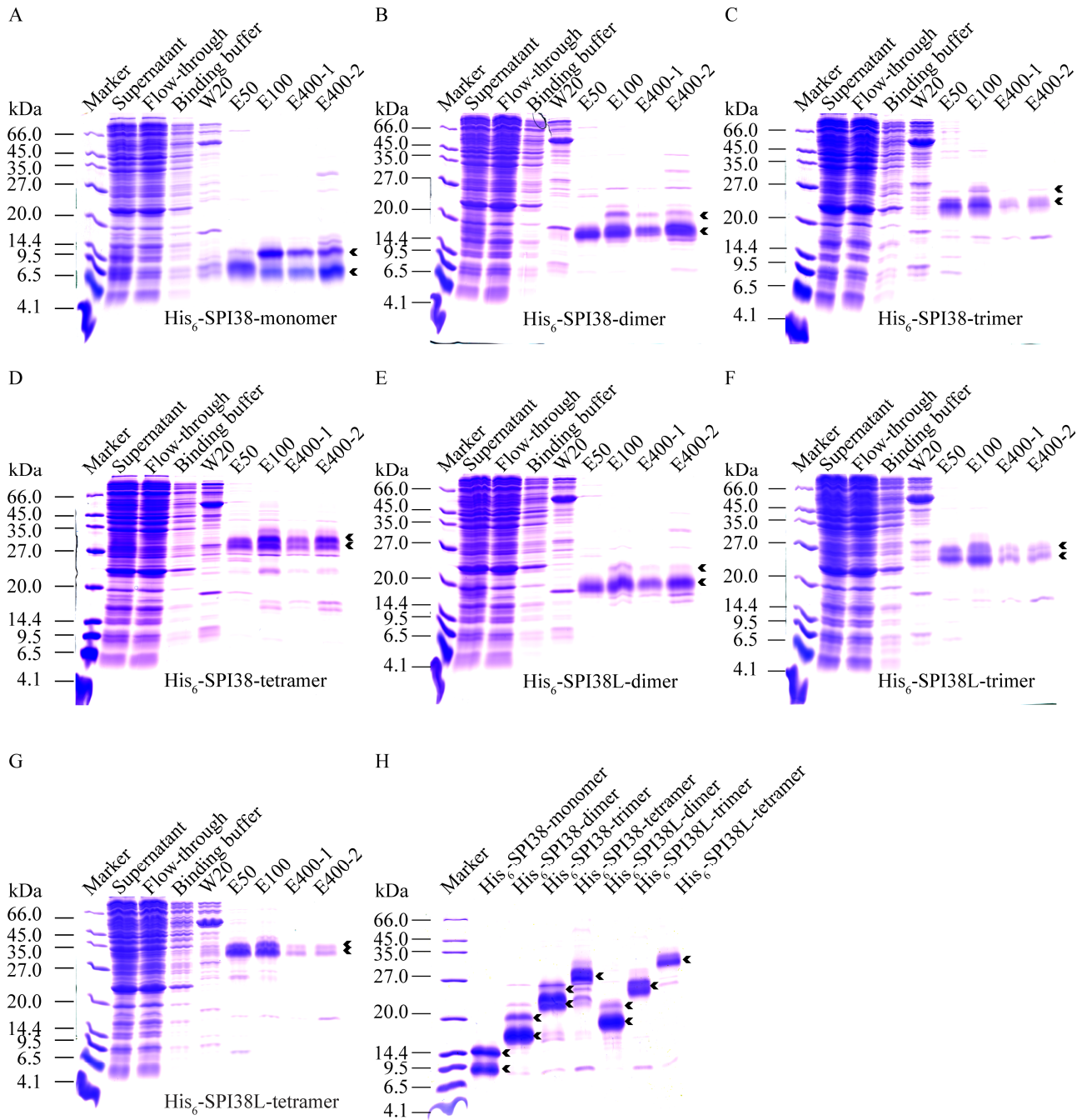


图3 BmSPI38 串联多聚体的纯化

Figure 3 Purification of BmSPI38 tandem multimers. Immobilized-nickel affinity chromatography of (A) His₆-SPI38-monomer, (B) His₆-SPI38-dimer, (C) His₆-SPI38-trimer, (D) His₆-SPI38-tetramer, (E) His₆-SPI38L-dimer, (F) His₆-SPI38L-trimer and (G) His₆-SPI38L-tetramer. H: Purified BmSPI38 tandem multimers after two rounds of immobilized-nickel affinity chromatography. Arrows show target proteins. “Supernatant” and “Flow-through” indicate supernatant of bacterial lysate and the column flow-through, respectively. “Binding buffer” refers to the part eluted by binding buffer. “W20” indicates wash buffer containing 20 mmol/L imidazole. “E50”, “E100” and “E400” indicate elution buffers containing 50 mmol/L, 100 mmol/L or 400 mmol/L imidazole, respectively.

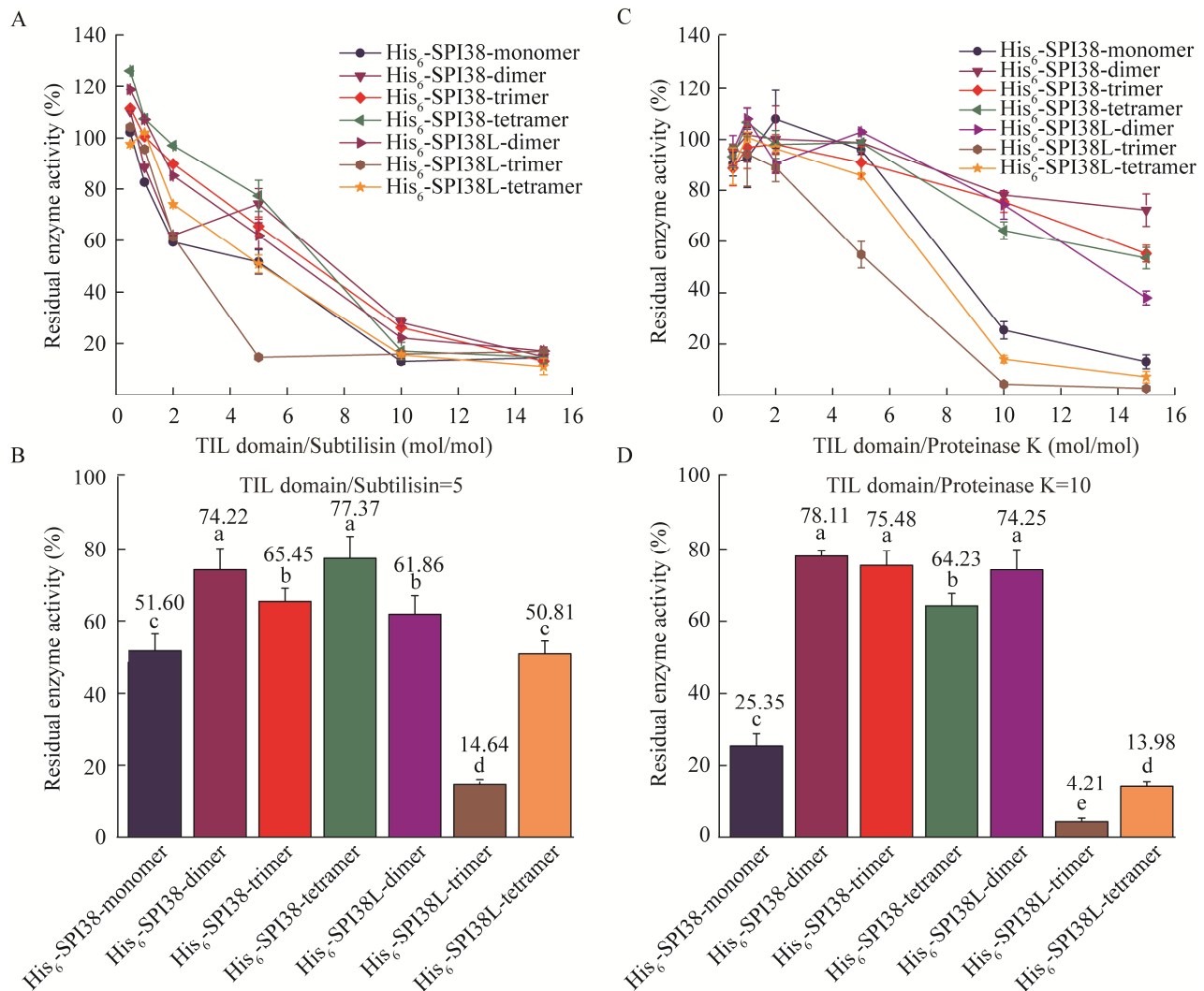


图4 采用蛋白酶抑制实验比较 BmSPI38 串联多聚体对微生物蛋白酶的抑制能力

Figure 4 Comparison of inhibitory capacity of BmSPI38 tandem multimers against microbial protease using protease inhibition assays. A: Inhibitory effects of increasing concentrations of BmSPI38 tandem multimers against subtilisin from *B. licheniformis*. B: Inhibitory activities of BmSPI38 tandem multimers against subtilisin when the ratio of TIL domain to protease is 5. C: Inhibitory effects of increasing concentrations of BmSPI38 tandem multimers against proteinase K from *E. album*. D: Inhibitory activities of BmSPI38 tandem multimers against proteinase K when the ratio of TIL domain to protease is 10. Error bars represent the standard error of the mean ($n=3$). Different letters "a–e" indicate a significant difference between groups ($P<0.05$), and one identical letter indicates no significant difference between groups ($P<0.05$).

2.5 BmSPI38 串联多聚体对家蚕病原真菌球孢白僵菌的分生孢子萌发的抑制能力

为了评价 BmSPI38 串联多聚体蛋白对家蚕病原真菌球孢白僵菌孢子萌发的抑制能力，将

TIL 结构域摩尔当量相同的抑制剂与分生孢子共孵育。结果显示，所有形式的串联体蛋白都能显著抑制球孢白僵菌分生孢子的萌发(图 5A、5B)。孵育 8 h 时，His₆-SPI38-trimer、His₆-SPI38-

tetramer、His₆-SPI38L-dimer 和 His₆-SPI38L-trimer 对分生孢子萌发的抑制效果均显著强于 His₆-SPI38-monomer。当孵育 12 h 时, PBS 处理组的孢子萌发率已达到 93.88%, 而 His₆-SPI38-monomer、His₆-SPI38-dimer、His₆-SPI38-trimer、His₆-SPI38-tetramer、His₆-SPI38L-dimer、His₆-SPI38L-trimer 和 His₆-SPI38L-tetramer 处理组的萌发率分别为 68.50%、76.37%、67.34%、68.85%、76.85%、67.61%和 65.94%。其中 His₆-SPI38L-tetramer 对孢子萌发的抑制能力显著强于 His₆-SPI38-monomer, 而 His₆-SPI38-dimer 和 His₆-SPI38L-dimer 对孢子萌发的抑制能力却不及 His₆-SPI38-monomer。His₆-SPI38-trimer、His₆-SPI38-tetramer、His₆-SPI38L-trimer 与 His₆-SPI38-monomer 处理组间的差异不显著。上述结果表明, 所有形式的串联体蛋白均能显著抑制球孢白僵菌分生孢子的萌发, 基于多肽柔性接头的串联四聚体化能够有效增强 BmSPI38 对球孢白僵菌分生孢子萌发的抑制能力。

2.6 BmSPI38 串联多聚体对单细胞真菌酿酒酵母和人类条件致病菌白色念珠菌生长的抑制作用

为了进一步研究 BmSPI38 串联多聚体蛋白是否具有广谱的抗真菌作用, 选取单细胞真菌酿酒酵母和多形态的机会性人类致病菌白色念珠

菌进行抑菌试验。结果表明, 所有形式的串联体蛋白均对酿酒酵母(图 6A、6B)和白色念珠菌(图 6C、6D)的生长均有抑制作用。当孵育 48 h 时, His₆-SPI38-trimer、His₆-SPI38L-dimer、His₆-SPI38L-trimer 和 His₆-SPI38L-tetramer 对酿酒酵母的抑制能力显著强于 His₆-SPI38-monomer; His₆-SPI38-monomer 对酿酒酵母生长的抑制率仅有 13.17%, 而 His₆-SPI38-trimer、His₆-SPI38L-dimer、His₆-SPI38L-trimer 和 His₆-SPI38L-tetramer 对酿酒酵母的抑制率分别为 21.09%、17.38%、20.16%和 19.23% (图 6A、6B)。抑制剂处理 24 h 时, His₆-SPI38-monomer、His₆-SPI38-dimer、His₆-SPI38-trimer、His₆-SPI38-tetramer、His₆-SPI38L-dimer、His₆-SPI38L-trimer 和 His₆-SPI38L-tetramer 对白色念珠菌的抑制率分别为 9.17%、11.26%、30.32%、13.43%、24.88%、9.56%和 13.55% (图 6D)。His₆-SPI38-dimer、His₆-SPI38-trimer、His₆-SPI38-tetramer、His₆-SPI38L-dimer 和 His₆-SPI38L-tetramer 对白色念珠菌的抑制能力显著高于 His₆-SPI38-monomer。在所有串联体蛋白中, 以 His₆-SPI38-trimer 对酿酒酵母和白色念珠菌的抑制能力最强。上述结果表明, BmSPI38 串联多聚体蛋白对酿酒酵母和白色念珠菌均有一定的抑制效果, 能够通过串联多聚体化来增强 BmSPI38 对上述 2 种真菌的抑制能力。

表 2 BmSPI38 串联多聚体中的 TIL 结构域对枯草杆菌蛋白酶和蛋白酶 K 的 IC₅₀

Table 2 The IC₅₀ of TIL domain in BmSPI38 tandem multimers for subtilisin and proteinase K

Protease inhibitor	IC ₅₀ of TIL domain for subtilisin (nmol/L)	IC ₅₀ of TIL domain for proteinase K (nmol/L)
His ₆ -SPI38-monomer	77.38±8.45	123.84±2.99
His ₆ -SPI38-dimer	140.07±7.18	254.43±22.14
His ₆ -SPI38-trimer	104.78±3.01	252.48±7.50
His ₆ -SPI38-tetramer	108.07±5.55	235.37±17.74
His ₆ -SPI38L-dimer	101.43±4.19	199.96±7.95
His ₆ -SPI38L-trimer	48.52±1.40	84.64±5.36
His ₆ -SPI38L-tetramer	78.20±5.81	112.36±1.27

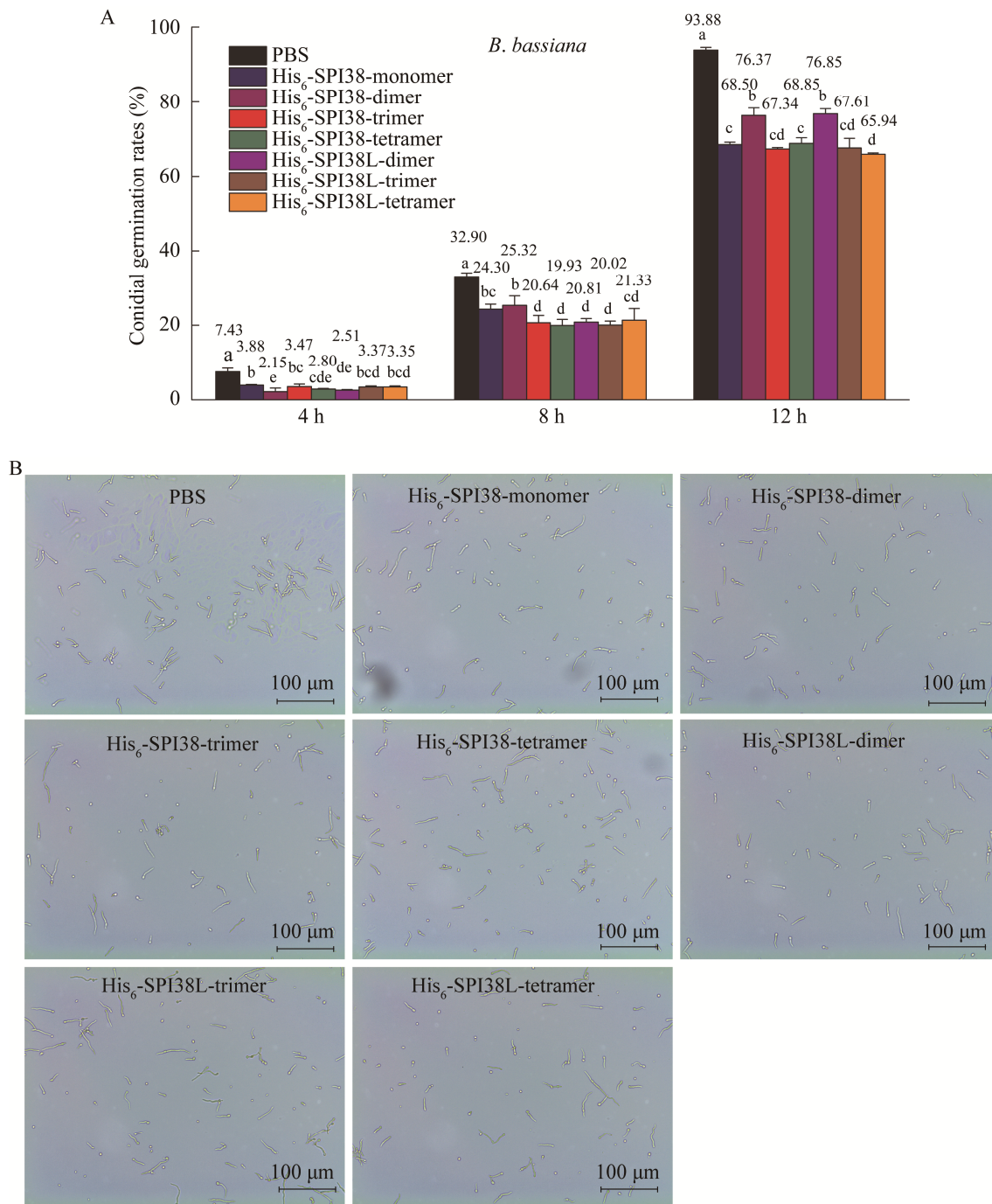


图 5 蛋白酶抑制剂对球孢白僵菌抑制能力的评价

Figure 5 Evaluation of inhibitory ability of protease inhibitors on *Beauveria bassiana*. A: Inhibitory effects of BmSPI38 tandem multimers on conidial germination. B: Microscopic observation of conidial germination in different treatment groups after incubation for 12 h. The control group was treated with equal volume of 20 mmol/L PBS. Error bars represent the standard error of the mean ($n=3$). Different letters “a–e” indicate a significant difference between groups ($P<0.05$), and one identical letter indicates no significant difference between groups ($P<0.05$).

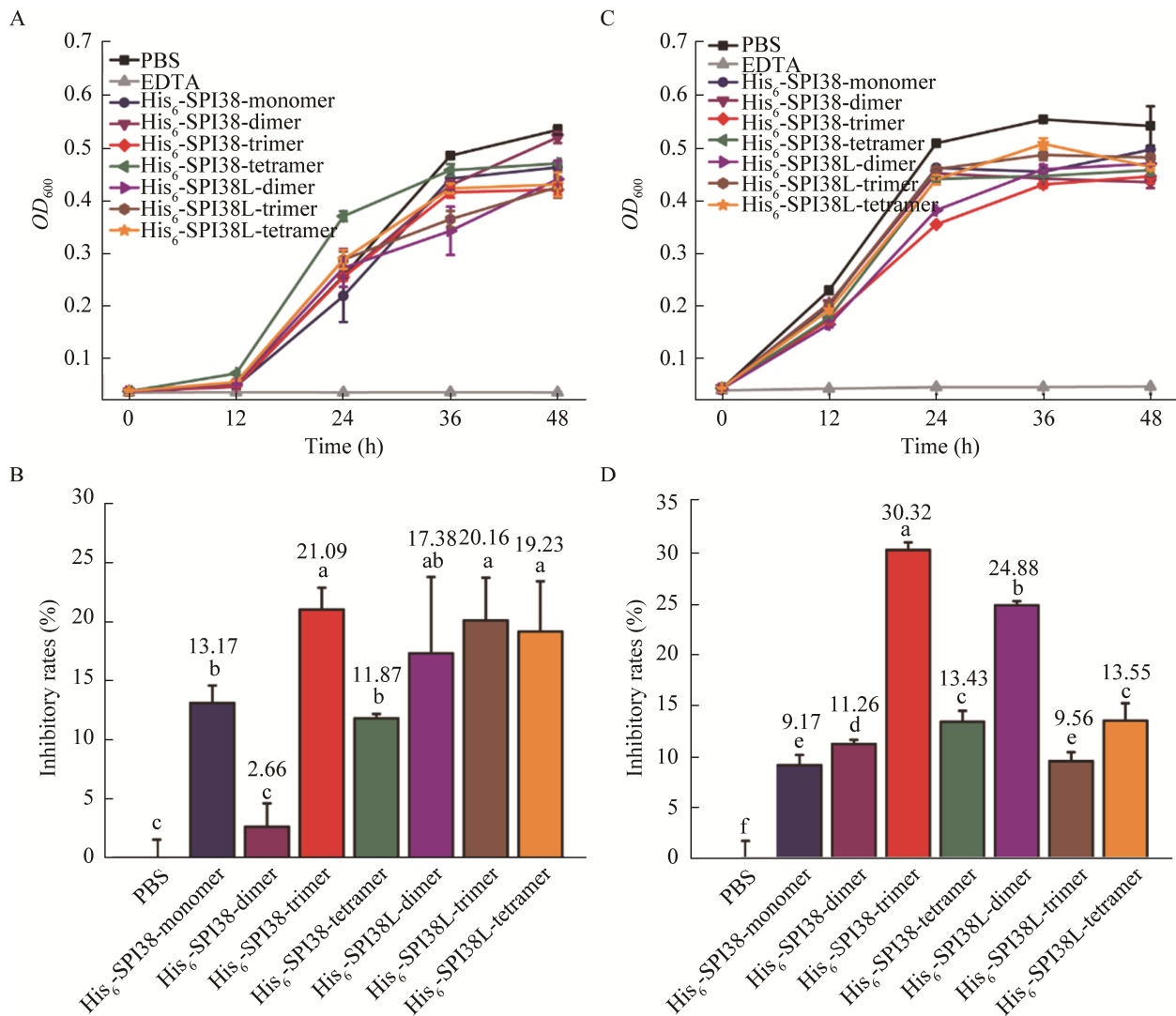


图 6 蛋白酶抑制剂对单细胞真菌酿酒酵母和机会性人类致病菌白色念珠菌的抑制作用

Figure 6 Evaluation of the inhibitory effects of protease inhibitors on single-celled fungus *Saccharomyces cerevisiae* and opportunistic human pathogen *Candida albicans*. A: Inhibitory effects of BmSPI38 tandem multimers on the growth of *S. cerevisiae*. B: Statistical analysis of growth inhibition rate of *S. cerevisiae* after incubation for 48 h. C: Inhibitory effects of BmSPI38 tandem multimers on the growth of *C. albicans*. D: Statistical analysis of growth inhibition rate of *C. albicans* after incubation for 24 h. An equal volume of sterile 20 mmol/L PBS was used as a negative control and 100 mmol/L EDTA was applied as positive control. Error bars represent the standard error of the mean ($n=3$). Different letters “a–e” indicate a significant difference between groups ($P<0.05$), and one identical letter indicates no significant difference between groups ($P<0.05$).

3 讨论与结论

本研究利用蛋白质工程手段成功获得有活性的 BmSPI38 的串联体蛋白，证实基于多肽柔性接头的串联多聚化不仅可以极大提高 BmSPI38

重组蛋白的结构均一性，还可以提高 BmSPI38 蛋白对枯草杆菌蛋白酶和蛋白酶 K 的抑制活性。BmSPI38 串联多聚体蛋白对昆虫致病性真菌球孢白僵菌、单细胞真菌酿酒酵母和机会性人类致病菌白色念珠菌均有一定的抑制效果，可以通过

串联多聚体化来增强 BmSPI38 对上述 3 种真菌的抑制能力。

蛋白酶抑制剂是体内蛋白酶催化活性的主要调节因子,它可以结合蛋白酶分子并抑制其生理活性。蛋白酶抑制剂在消化、凝血、酚氧化酶级联反应、细胞迁移和炎症反应等诸多生理过程中发挥重要功能^[29-33]。蛋白质的多聚化现象普遍存在于生物体内,许多受体、真菌免疫调节蛋白、蛋白酶等都倾向于或以多聚体的形式存在和发挥作用。在蛋白酶抑制剂中也发现了这种多聚化现象,多聚化对蛋白酶抑制剂的高级结构及生物活性具有重要的调节作用^[34]。Ecotin 是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂,可由包括病原体在内的数百种微生物产生。Ecotin 对胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、弹性蛋白酶超家族中的几乎所有丝氨酸蛋白酶都有非常广泛的抑制特异性,可保护微生物免受宿主免疫反应的影响^[35-37]。研究发现,二聚化的 Ecotin 能够与蛋白酶结合形成具有 3 个不同结合界面的异型四聚体^[35]。半胱氨酸蛋白酶抑制剂胱抑素 C 在血管重塑、炎症等多种生理、病理过程中发挥着重要作用,可通过改变寡聚化状态来调节其活性^[38-39]。DM43 是由南美负鼠 (*Didelphis marsupialis*)血清中分离出来的一种同型二聚化的金属蛋白酶抑制剂,它以非共价的方式与巴西具窝蝮蛇(*Bothrops jararaca*)蛇毒中的金属蛋白酶 Jararhagin 结合,并有效地中和其毒性^[40]。研究表明,二聚化是决定 DM43 蛋白结构和稳定性的关键,从而使其构象适应各种不同环境和结合蛋白^[41]。

笔者前期的研究发现,家蚕 TIL 类蛋白酶抑制剂 BmSPI38 和 BmSPI39 能够通过抑制真菌分泌的毒力蛋白酶活性来抑制病原性真菌入侵家蚕^[18-19]。单拷贝的 BmSPI38、BmSPI39 编码的重组蛋白在体外的结构均一性较差,易发生多聚体,形成二聚体、三聚体和四聚体^[22-23]。Western

blotting 等证据表明,家蚕 TIL 类蛋白酶抑制剂 BmSPI38 和 BmSPI39 在各组织中的生理形式主要为四聚体,少量以三聚体,提示多聚化对该类抑制剂生理活性的发挥极为重要^[23]。本研究利用串联基因融合表达的策略,极大提高了重组 BmSPI38 蛋白的结构均一性(图 2D-2F)。构建串联表达载体可有效提高小分子重组蛋白(肽)表达量和结构稳定性,并能屏蔽毒蛋白对宿主的伤害作用,因而被广泛采用^[42-49]。胸腺素 $\beta 4$ (thymosin beta4, T β 4)是人体内主要的肌动蛋白调节因子之一,具有广泛的生物学活性,与细胞骨架平衡、炎症反应、创伤愈合、血管再生、细胞凋亡、角膜及心肌修复等密切相关。研究人员在大肠杆菌中成功表达了 4xT β 4 蛋白,并证实其活性与现有的商品化的 T β 4 蛋白类似或更好^[42]。将 6 个拷贝的血管紧张素 I 转换酶抑制肽 (angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide, ACE-IP)基因串联起来插入表达载体,实现串联肽在大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 中融合表达^[44]。除此之外,串联表达也为大规模生产抗糖尿病药物苦瓜降糖肽 MC6 提供了一种方便、经济的方法^[48]。基于接头序列的串联多聚体蛋白的结构均一性优于单拷贝 BmSPI38 基因的表达产物的原因或许是由于串联表达避免了不同聚合程度的多聚体的随机形成。

前期研究证实 BmSPI38 能够强烈抑制枯草杆菌蛋白酶、蛋白酶 K、蜂蜜曲霉蛋白酶和球孢白僵菌的毒力蛋白酶 CDEP-1^[18]。本研究发现基于多肽柔性接头的串联三聚体化和四聚体化能够极大提高 BmSPI38 对微生物蛋白酶的抑制能力。需要指出的是,尽管 His₆-SPI38-tetramer 对枯草杆菌蛋白酶抑制能力弱于 His₆-SPI38-trimer 和 His₆-SPI38L-dimer,其对蛋白酶 K 的抑制能力却显著强于 His₆-SPI38-trimer 和 His₆-SPI38L-dimer,表明每个串联蛋白对不同蛋白酶的抑制

具有一定的选择性(图 4)。迄今为止,尚无 BmSPI38 与蛋白酶结合的高级结构数据, BmSPI38 多聚体的形成机制和对不同蛋白酶具体的作用机制尚待深入研究。

前期研究发现, BmSPI38 既能抑制球孢白僵菌毒力蛋白酶诱导的有害黑化,还可以抑制球孢白僵菌的分生孢子萌发,进而提高家蚕的生存率^[18-19]。本研究进一步证实了所有形式的 BmSPI38 串联体蛋白均能显著抑制球孢白僵菌分生孢子的萌发,基于多肽柔性接头的串联四聚体化能够有效增强 BmSPI38 对球孢白僵菌分生孢子萌发的抑制能力(图 5)。笔者对已报道的半胱氨酸蛋白酶抑制剂、丝氨酸蛋白酶抑制剂和金属蛋白酶抑制剂的多聚化研究进行了简要汇总,发现大部分的蛋白酶抑制剂以二聚体的形式发挥功能,更高阶的多聚体形式是基于二聚体结构的进一步寡聚^[34]。许多具有抗真菌效应的丝氨酸蛋白酶抑制剂也存在二聚化现象。研究发现,家蚕茧壳中的丝氨酸蛋白酶抑制剂 BmSPI51 能够显著抑制球孢白僵菌、白色念珠菌和酿酒酵母的孢子生长^[50]。SDS-PAGE 结果显示,基于原核表达技术获得的 BmSPI51 重组蛋白的表观分子量约为 12 kDa,与其二聚体大小一致,提示其可能以二聚体形式发挥功能^[50]。此外,玉米中分子量约 14 kDa 的胰蛋白酶抑制剂能够抑制植物病原真菌的分生孢子萌发和菌丝生长。SDS-PAGE 结果表明,大肠杆菌中表达的 TI 重组蛋白主要以单体形式存在,少部分以二聚体形式存在^[51]。BmSPI38 串联四聚体化是否基于二聚体结构的进一步二聚化尚不清楚, BmSPI38 与靶标蛋白酶的作用机制也有待进一步研究。

众所周知,真菌感染成为影响全球公共卫生健康的重大威胁因素之一,现有抗真菌药物带来的毒副作用和耐药性等问题日益突出,因此寻找新型、高效、安全的抗真菌药物迫在眉睫。白色

念珠菌是侵袭性真菌中最常见的机会致病菌。本研究发现 BmSPI38 蛋白对白色念珠菌有明显的抑制效果,且串联多聚体化能够显著增强其抗真菌能力。尽管已有不少研究证实家蚕蛋白酶抑制剂的抗真菌效应,但其抗菌谱和具体抗菌机制尚不完全清楚,仍需更多的实验数据支撑。具有抗菌效应的蛋白酶抑制剂的开发与应用研究尚待加强。需要指出的是,在所有串联体蛋白中,以 His₆-SPI38-trimer 对酿酒酵母和白色念珠菌的抑制能力最强,但其对枯草杆菌蛋白酶和蛋白酶 K 的抑制活性却不及 His₆-SPI38L-trimer、His₆-SPI38L-tetramer 和 His₆-SPI38-monomer,这或许与不同真菌生长过程中分泌的蛋白酶种类和丰度差异有关。

综上所述,本研究成功实现家蚕蛋白酶抑制剂 BmSPI38 在大肠杆菌中的可溶表达,并证实串联多聚体化能够提高 BmSPI38 的结构均一性和抗真菌能力。研究结果不仅有助于深化人们对家蚕抗真菌因子 BmSPI38 作用机制的认识,为培育抗真菌转基因家蚕素材提供重要的理论依据和新策略,还将推动其外源生产及在医疗领域的开发和应用。

REFERENCES

- [1] XIA QY, ZHOU ZY, LU C, CHENG DJ, DAI FY, LI B, ZHAO P, ZHA XF, CHENG TC, CHAI CL, PAN GQ, XU JS, LIU C, LIN Y, QIAN JF, HOU Y, WU ZL, LI GR, PAN MH, LI CF, et al. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*)[J]. Science (New York, NY), 2004, 306(5703): 1937-1940.
- [2] XIA QY, CHENG DJ, DUAN J, WANG GH, CHENG TC, ZHA XF, LIU C, ZHAO P, DAI FY, ZHANG Z, HE NJ, ZHANG L, XIANG ZH. Microarray-based gene expression profiles in multiple tissues of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*[J]. Genome Biology, 2007, 8(8): R162.
- [3] DUAN J, LI RQ, CHENG DJ, FAN W, ZHA XF, CHENG TC, WU YQ, WANG J, MITA K, XIANG ZH,

- XIA QY. SilkDB v2.0: a platform for silkworm (*Bombyx mori*) genome biology[J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(suppl_1): D453-D456.
- [4] XIA QY, LI S, FENG QL. Advances in silkworm studies accelerated by the genome sequencing of *Bombyx mori*[J]. Annual Review of Entomology, 2014, 59: 513-536.
- [5] XIONG Q, XIE YP, ZHU YM, XUE JL, LI J, FAN RJ. Morphological and ultrastructural characterization of *Carposina sasakii* larvae (Lepidoptera: Carposinidae) infected by *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales: Clavicipitaceae)[J]. Micron, 2013, 44: 303-311.
- [6] CHARNLEY AK. Physiological Aspects of Destructive Pathogenesis in Insects by Fungi: a Speculative Review[M]. London: Cambridge University Press, 1984: 229-270.
- [7] GOETTEL MS, LEGER RJS, RIZZO NW, STAPLES RC, ROBERTS DW. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle[J]. Journal of General Microbiology, 1989, 135(8): 2233-2239.
- [8] ST LEGER RJ. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects[J]. Canadian Journal of Botany, 1995, 73(S1): 1119-1125.
- [9] CHARNLEY AK. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxin[J]. Advances in Botanical Research, 2003, 40: 241-321.
- [10] ST LEGER R, JOSHI L, BIDOCHKA MJ, ROBERTS DW. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(13): 6349-6354.
- [11] ZHANG YJ, FENG MG, FAN YH, LUO ZB, YANG XY, WU D, PEI Y. A cuticle-degrading protease (CDEP-1) of *Beauveria bassiana* enhances virulence[J]. Biocontrol Science and Technology, 2008, 18(6): 543-555.
- [12] YANG JK, ZHAO XN, LIANG LM, XIA ZY, LEI LP, NIU XM, ZOU CG, ZHANG KQ. Overexpression of a cuticle-degrading protease Ver112 increases the nematicidal activity of *Paecilomyces lilacinus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(6): 1895-1903.
- [13] KANOST MR. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity[J]. Developmental & Comparative Immunology, 1999, 23(4-5): 291-301.
- [14] FULLAONDO A, GARCÍA-SÁNCHEZ S, SANZ-PARRA A, RECIO E, LEE SY, GUBB D. Spn1 regulates the GGBP3-dependent Toll signaling pathway in *Drosophila melanogaster*[J]. Molecular and Cellular Biology, 2011, 31(14): 2960-2972.
- [15] CERENIUS L, KAWABATA SI, LEE BL, NONAKA M, SÖDERHÄLL K. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2010, 35(10): 575-583.
- [16] CHEN KK, LU ZQ. Immune responses to bacterial and fungal infections in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2018, 83: 3-11.
- [17] 李游山, 路庆君, 杨玺, 张杰, 罗竹星, 夏庆友, 赵萍. 家蚕抗真菌因子 BmSPI39 对球孢白僵菌入侵的表达响应[J]. 昆虫学报, 2021, 64(1): 61-69.
- LI YS, LU QJ, YANG X, ZHANG J, LUO ZX, XIA QY, ZHAO P. Expression of the fungal-resistance factor BmSPI39 in *Bombyx mori* in response to *Beauveria bassiana* invasion[J]. Acta Entomologica Sinica, 2021, 64(1): 61-69 (in Chinese).
- [18] LI YS, ZHAO P, LIU SP, DONG ZM, CHEN JP, XIANG ZH, XIA QY. A novel protease inhibitor in *Bombyx mori* is involved in defense against *Beauveria bassiana*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 42(10): 766-775.
- [19] LI YS, ZHAO P, LIU HW, GUO XM, HE HW, ZHU R, XIANG ZH, XIA QY. TIL-type protease inhibitors may be used as targeted resistance factors to enhance silkworm defenses against invasive fungi[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 57: 11-19.
- [20] LI YS, LIU HW, ZHU R, XIA QY, ZHAO P. Protease inhibitors in *Bombyx mori* silk might participate in protecting the pupating larva from microbial infection[J]. Insect Science, 2016, 23(6): 835-842.
- [21] DONG ZM, XIA QY, ZHAO P. Antimicrobial components in the cocoon silk of silkworm, *Bombyx mori*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 224: 68-78.
- [22] LI YS, LIU HW, ZHU R, XIA QY, ZHAO P. Loss of second and sixth conserved cysteine residues from trypsin inhibitor-like cysteine-rich domain-type protease inhibitors in *Bombyx mori* may induce activity against microbial proteases[J]. Peptides, 2016, 86: 13-23.
- [23] LI YS, DONG ZM, LIU HW, ZHU R, BAI Y, XIA QY, ZHAO P. The fungal-resistance factors BmSPI38 and

- BmSPI39 predominantly exist as tetramers, not monomers, in *Bombyx mori*[J]. *Insect Molecular Biology*, 2018, 27(6): 686-697.
- [24] LI YS, WEI M, ZHANG J, ZHU R, WANG Y, ZHANG ZF, CHEN CQ, ZHAO P. Amino acid substitutions at P1 position change the inhibitory activity and specificity of protease inhibitors BmSPI38 and BmSPI39 from *Bombyx mori*[J]. *Molecules*, 2023, 28(5): 2073.
- [25] JONGSMA MA, BAKKER PL, STIEKEMA WJ. Quantitative determination of serine proteinase inhibitor activity using a radial diffusion assay[J]. *Analytical Biochemistry*, 1993, 212(1): 79-84.
- [26] YAKOBY N, RASKIN I. A simple method to determine trypsin and chymotrypsin inhibitory activity[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2004, 59(3): 241-251.
- [27] WRIGGERS W, CHAKRAVARTY S, JENNINGS PA. Control of protein functional dynamics by peptide linkers[J]. *Peptide Science*, 2005, 80(6): 736-746.
- [28] ZHAO HL, YAO XQ, XUE C, WANG Y, XIONG XH, LIU ZM. Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon-alpha2b fusion protein by linker engineering[J]. *Protein Expression and Purification*, 2008, 61(1): 73-77.
- [29] MACEDO MLR, DIZ FILHO EBS, FREIRE MGM, OLIVA MLV, SUMIKAWA JT, TOYAMA MH, MARANGONI S. A trypsin inhibitor from *Sapindus saponaria* L. seeds: purification, characterization, and activity towards pest insect digestive enzyme[J]. *The Protein Journal*, 2011, 30(1): 9-19.
- [30] DOWNING MR, BLOOM JW, MANN KG. Comparison of the inhibition of thrombin by three plasma protease inhibitors[J]. *Biochemistry*, 1978, 17(13): 2649-2653.
- [31] ELLIS V, SCULLY M, MACGREGOR I, KAKKAR V. Inhibition of human factor Xa by various plasma protease inhibitors[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1982, 701(1): 26-31.
- [32] ZOU Z, JIANG HB. *Manduca sexta* serpin-6 regulates immune serine proteinases PAP-3 and HP8[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(14): 14341-14348.
- [33] TANG HP, KAMBRIS Z, LEMAITRE B, HASHIMOTO C. A serpin that regulates immune melanization in the respiratory system of *Drosophila*[J]. *Developmental Cell*, 2008, 15(4): 617-626.
- [34] 杨玺, 张杰, 李游山. 蛋白酶抑制剂的多聚体化对其生理功能的影响[J]. *生理科学进展*, 2021, 52(3): 236-240.
- YANG X, ZHANG J, LI YS. Effect of multimerization of protease inhibitors on their physiological functions[J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2021, 52(3): 236-240 (in Chinese).
- [35] GILLMOR SA, TAKEUCHI T, YANG SQ, CRAIK CS, FLETTERICK RJ. Compromise and accommodation in ecotin, a dimeric macromolecular inhibitor of serine proteases[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 299(4): 993-1003.
- [36] NAGY ZA, SZAKÁCS D, BOROS E, HÉJA D, VÍGH E, SÁNDOR N, JÓZSI M, OROSLÁN G, DOBÓ J, GÁL P, PÁL G. Ecotin, a microbial inhibitor of serine proteases, blocks multiple complement dependent and independent microbicidal activities of human serum[J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(12): e1008232.
- [37] GARCIA FB, DINIZ CABRAL A, FUHLENDORF MM, DA CRUZ GF, dos SANTOS JV, FERREIRA GC, de REZENDE BRC, SANTANA CM, PUZER L, DAISHI SASAKI S, GARCIA W, SPERANÇA MA. Functional and structural characterization of an ecotin-like serine protease inhibitor from *Trypanosoma cruzi*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 151: 459-466.
- [38] EKIEL I, ABRAHAMSON M. Folding-related dimerization of human cystatin C[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(3): 1314-1321.
- [39] EKIEL I, ABRAHAMSON M, FULTON DB, LINDAHL P, STORER AC, LEVADOUX W, LAFRANCE M, LABELLE S, POMERLEAU Y, GROLEAU D, LESAUTEUR L, GEHRING K. NMR structural studies of human cystatin C dimers and monomers[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 271(2): 266-277.
- [40] BRAND GD, SALBO R, JØRGENSEN TJD, BLOCH C JR, ERBA EB, ROBINSON CV, TANJONI I, M MOURA-DA-SILVA A, ROEPSTORFF P, DOMONT GB, PERALES J, VALENTE RH, NEVES-FERREIRA AGC. The interaction of the antitoxin DM43 with a snake venom metalloproteinase analyzed by mass spectrometry and surface plasmon resonance[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2012, 47(5): 567-573.
- [41] CHAPEAUROUGE A, MARTINS SM, HOLUB O, ROCHA SLG, VALENTE RH, NEVES-FERREIRA AGC, FERREIRA ST, DOMONT GB, PERALES J. Conformational plasticity of DM43, a

- metalloproteinase inhibitor from *Didelphis marsupialis*: chemical and pressure-induced equilibrium (un)folding studies[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2009, 1794(10): 1379-1386.
- [42] WANG XL, YANG GH, LI SS, GAO MF, ZHAO PF, ZHAO LX. The *Escherichia coli*-derived thymosin β 4 concatemer promotes cell proliferation and healing wound in mice[J]. *BioMed Research International*, 2013, 2013: 241721.
- [43] CHEN YH, ZHAO LX, SHEN GA, CUI LJ, REN WW, ZHANG H, QIAN HM, TANG KX. Expression and analysis of thymosin α 1 concatemer in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2008, 49(1): 51-56.
- [44] FIDA HM, KUMADA Y, TERASHIMA M, KATSUDA T, KATO S. Tandem multimer expression of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Journal*, 2009, 4(9): 1345-1356.
- [45] PARK CJ, LEE JH, HONG SS, LEE HS, KIM SC. High-level expression of the angiotensin-converting-enzyme-inhibiting peptide, YG-1, as tandem multimers in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 50(1): 71-76.
- [46] LIU D, SUN HY, ZHANG LJ, LI SM, QIN ZY. High-level expression of milk-derived antihypertensive peptide in *Escherichia coli* and its bioactivity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(13): 5109-5112.
- [47] RAO XC, HU JC, LI S, JIN XL, ZHANG C, CONG YG, HU XM, TAN YL, HUANG JJ, CHEN ZJ, ZHU JM, HU FQ. Design and expression of peptide antibiotic hPAB- β as tandem multimers in *Escherichia coli*[J]. *Peptides*, 2005, 26(5): 721-729.
- [48] WANG FJ, SONG HL, WANG XM, ZHANG WJ, WANG BL, ZHAO J, HU ZB. Tandem multimer expression and preparation of hypoglycemic peptide MC6 from *Momordica charantia* in *Escherichia coli*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166(3): 612-619.
- [49] GULER HI. Recombinant production of opiorphin pentapeptide as tandem multimers through rational design of primers[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2020, 56(2): 141-148.
- [50] ZHANG XL, GUO KY, DONG ZM, CHEN ZY, ZHU HT, ZHANG Y, XIA QY, ZHAO P. Kunitz-type protease inhibitor BmSPI51 plays an antifungal role in the silkworm cocoon[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2020, 116: 103258.
- [51] CHEN ZY, BROWN RL, LAX AR, CLEVELAND TE, RUSSIN JS. Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(3): 1320-1324.

(本文责编 郝丽芳)