

家蝇基因工程抗菌肽的研究进展

万玲¹, 王梅梅², 孔令聪¹, 裴志花¹, 刘树明¹, 马红霞^{1,3*}

(1. 吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118; 2. 吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118;

3. 吉林农业大学动物生产及产品质量安全教育部重点实验室, 长春 130118)

[收稿日期] 2013-08-16 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2013)10-0066-04 [中图分类号] S859.79

[摘要] 利用基因工程技术获取家蝇抗菌肽能克服传统方法产量低、耗时长、无法实现大规模生产等缺点, 是目前获取家蝇抗菌肽最为有效的方法。对家蝇基因工程抗菌肽的分类、编码基因的获得和表达以及生物活性方面进行了综述, 以期兽医临床早日研制出高效、低毒且不易产生耐药性的新兽药提供参考。

[关键词] 家蝇; 抗菌肽; 基因工程; 生物活性

Research Progress of *Musca domestica* Antimicrobial Peptides Obtained by Genetic Engineering

WAN Ling¹, WAN Mei-mei², KONG Ling-cong¹, PEI Zhi-hua¹, LIU Shu-ming¹, MA Hong-xia^{1,3}

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

3. Animal Production & Product Quality and Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: The engineering techniques is the most effective way to obtain the *Musca domestica* antibacterial peptide that has overcome the disadvantages of traditional method that low yield, time-consuming and can not achieve large-scale production. The classification of *Musca domestica* antimicrobial peptide by gene engineering, acquisition and expression of the encoding gene and biologically active are reviewed in order to provide a reference for developing new veterinary medicine which is efficiency, low toxicity and low drag-resistance in veterinary clinical early.

Key words: *Musca domestica*; antibacterial peptide; gene engineering; biological activity

抗菌肽是生物体内部分无环状结构的小分子多肽, 是防御病原微生物入侵的天然屏障^[1], 具有非特异性抗细菌、真菌、病毒、寄生虫和肿瘤细胞等作用。与传统的抗生素相比, 它具有分子量小、抗菌谱广、热稳定性好等优点。自 1972 年瑞典科学家 Boman G 等首次从惜古比天蚕蛹中分离出天蚕素 (cecropin) 后^[2], 人们相继从细菌、真菌、昆虫、植

物、动物乃至人体内均分离得到抗菌肽。

家蝇常生活在病原菌孳生的环境中, 能在人、畜之间通过机械传播多种疾病^[3], 而自身并不染病, 经研究发现这种极强的抗病能力缘于其体内含有一类特殊的小分子多肽即抗菌肽。而从家蝇体内直接提取纯化抗菌肽具有产量低、技术要求高、难以规模化生产的缺点; 而化学方法虽然快速, 但

基金项目: 教育部新世纪优秀人才项目 (NCET-10-0174)

作者简介: 万玲, 硕士研究生, 从事动物药理与毒理学研究。

通讯作者: 马红霞。E-mail: hongxia0731001@163.com

存在生产成本高等问题。随着现代基因工程技术的发展,通过基因工程技术来大规模制备家蝇抗菌肽已成为研究热点。

1 家蝇基因工程抗菌肽的分类

目前利用基因工程技术从家蝇体内获得的抗菌肽有五种:①家蝇天蚕素(cecropin),对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均有作用,少数还具有抗真菌作用^[4];②家蝇防御素(defensin),主要对革兰氏阳性菌起作用,但有的也具有广谱的抗菌活性^[5];③家蝇溶菌酶(MDL),其中MDL-1一般只对革兰氏阴性菌具有活性^[6],MDL-2和MDL-3仅对少数革兰氏阴性菌有抑制作用^[7];④家蝇双翅肽(Diptericins),仅对少数革兰氏阴性菌有抑制作用^[7];⑤家蝇攻击素(Attacin),只对少数革兰氏阴性菌有抑制作用^[7]。

2 家蝇抗菌肽编码基因的获得与表达

2.1 利用差异显示技术筛选家蝇抗菌肽编码基因 差异显示技术是由Liang和Pardee 1992年创立,1994年ErrieHaay等将其正式命名为差异显示反转录聚合酶链式反应(DDRT-PCR)。它是一种快速、灵敏且易于操作的分离差异表达基因的方法。金小宝等^[8]首次采用差异显示技术对诱导后家蝇幼虫差异表达基因进行筛选,经Northern杂交鉴定出阳性片段,并克隆得到两个在GeneBank中未找到与其具有高度同源性的家蝇基因序列。

2.2 利用基因芯片技术筛选家蝇抗菌肽编码基因 基因芯片技术是指将大量探针分子固定于支持物上,然后与标记的样品进行杂交,通过检测杂交信号的强度及分布进而对靶分子的序列和数量进行分析。它是一种操作简便、自动化程度高、一次可检测大量序列的方法。刘雷山等^[9]将GenBank中部分昆虫抗菌肽基因保守域设计高特异性探针,构建oligo探针微阵列,与Cy3标记的诱导后24h的家蝇三龄幼虫脂肪体cDNA杂交,对家蝇抗菌肽相关基因进行有效筛选,得出14个有效杂交信号所对应的基因并对其进行克隆。

2.3 通过构建抑制性消减杂交文库筛选家蝇抗菌肽编码基因 抑制性消减杂交技术(SSH)是能够比较两种不同mRNA组和获得仅在一mRNA组中表达而在另一mRNA组中没有表达的强有力的技术。与其它技术相比,SSH技术具有假阳性率低、特异性高、操作简便、周期短等优点,也是目前最常用的方法。李殿香等^[10]应用抑制性消减杂交技

术,构建大肠杆菌和金黄色葡萄球菌诱导家蝇幼虫后差异表达cDNA消减文库,获得了差异表达基因的cDNA片段,经鉴定有包括抗菌肽基因在内的36种蛋白的基因片段。笔者所在实验室采用该技术以三日龄家蝇幼虫为材料经多种病原微生物(沙门氏菌、猪肺炎支原体、巴氏杆菌等)诱导,对家蝇抗菌肽基因进行了高通量筛选,取得了预期效果,目前已经对筛选到的基因进行克隆与表达,并正在对表达产物的活性进行分析。

研究家蝇抗菌肽基因的表达,目前普遍使用以大肠杆菌为主要代表的原核表达系统以及真核表达系统。

2.4 家蝇抗菌肽基因在大肠杆菌表达系统中的表达 由于大肠杆菌具有易培养、生长繁殖快速、外源基因表达产物水平高等优点,因此该系统多被用于表达家蝇抗菌肽基因。在大肠杆菌中表达家蝇抗菌肽基因最常用的表达载体包括pET系统和pGEX系统。

2.4.1 用pET表达载体表达家蝇抗菌肽基因 pET系统是在大肠杆菌中克隆表达重组蛋白功能比较强大的系统。克隆到pET载体的基因是被关闭的,不会因为产生的蛋白对细胞有毒性而引起质粒不稳定。根据目的蛋白特定信息和应用、克隆策略、蛋白溶解性及细胞定位、需要的融合标签的种类来选择合适的pET载体。

大肠杆菌系统表达家蝇抗菌肽基因常形成包涵体而影响表达蛋白的生物活性及构像,通过选择载体可以改善目的蛋白溶解性或正确折叠使其以具有生物活性的可溶性状态进行融合表达:①选择具有本身溶解性高的多肽序列[如谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、硫氧还蛋白(Trx)及NusA(Nutilization substance A)]的pET载体;②选择具有能催化二硫键形成的酶(如Trx、DsbA、DsbC)的pET载体;③选择能将蛋白转运到细胞周质的带有信号序列(如DsbA、DsbC)的pET载体。因pET载体具有6×组氨酸标签(His-tag),在纯化蛋白时,可以利用镍离子(Ni^{+})亲和层析柱进行纯化,镍柱中所含层析胶的基质上连接了一个氮基三乙酸(NTA)可以与 Ni^{+} 结合,而 Ni^{+} 可以与融合蛋白的6×His-tag之间产生吸引力,从而将带有His-tag的融合蛋白与其他杂蛋白区分开来。

国果等^[11]运用pET-28a表达载体成功构建了MDC I基因的表达质粒,重组蛋白在大肠杆菌

中获得了高效表达。Xueli Zheng、刘变芳等^[12-13]运用 pET-32a 表达载体成功构建了家蝇抗菌肽 Cecropin A 基因和果蝇抗菌肽 Andropin 基因的表达质粒,经诱导后均获得了高效表达的融合蛋白。郑立等^[14]将克隆得到的家蝇的 lysozyme 2 基因(MdL2)与表达载体 pET-DsbA 连接,在大肠杆菌表达系统中得到高效表达。

2.4.2 利用 pGEX 表达载体表达家蝇抗菌肽基因表达融合蛋白的载体 pGEX 是 Smith 和 Johnson 于 1957 年构建的,它具有一个大小为 26 kD 的谷胱甘肽 S-转移酶基因,具有蛋白纯化条件温和、对宿主无选择性、无变性剂加入等特点,利用亲和层析的方法纯化后获得的蛋白能最大限度保持其空间构象和免疫原性的特点,具有较好的应用价值。

王来城^[15]、许琴英^[16]等将克隆得到的家蝇防御素(defensin)基因重组到 pGEX-4T-1 表达载体中在大肠杆菌中获得高效表达。赵平森等^[17]将克隆成功的家蝇 cecropin 基因片段定向重组于原核表达载体 pGEX-6P-1 中,在大肠杆菌中获得高效表达。徐建华^[18]、杨晓蓉^[19]等将克隆得到家蝇抗菌肽 Attacin 和 dipteracin2 的基因片段定向插入到表达载体 pGEX-4T-1 上,在大肠杆菌中获得表达。

由于原核表达系统操作简单、成本较低,很多科研工作者选择其来表达家蝇抗菌肽基因,但家蝇抗菌肽基因本身是真核基因,其在原核表达系统中表达的蛋白往往不能正确的折叠,而且对大肠杆菌宿主细胞也有杀伤作用,使得真核表达系统成为目前研究家蝇抗菌肽基因工程的热点。

2.5 家蝇抗菌肽基因在真核表达系统中的表达
常用于表达家蝇抗菌肽基因的系统包括酵母表达系统和哺乳动物细胞表达系统。

2.5.1 家蝇抗菌肽基因在毕赤酵母表达系统中表达 酵母表达系统具有强效启动子、外源基因产物表达量高、培养简单经济等优点。金丰良等^[20]将家蝇防御素与酵母分泌型表达载体 pPICZ α -A 构建重组表达质粒并在毕赤酵母 GS115 得到表达。仇妍虹等^[21]将家蝇防御素抗菌肽成熟肽基因重组于酵母表达载体 pPICZ α -A 中,在毕赤酵母 SMD1168 中成功获得表达。李小波、金小宝等^[22-23]将家蝇抗菌肽 attacin 和 Defensin 基因克隆至酵母分泌型表达载体 pPIC9K 中,在毕赤酵母 GS115 中获得高效表达。

2.5.2 家蝇抗菌肽基因在哺乳动物细胞表达系统中的表达 哺乳动物细胞表达系统能够指导蛋白质的正确折叠,提供多种翻译后加工功能,表达产物接近于天然的蛋白质分子,常用于外源基因的表达。常用于表达家蝇抗菌肽基因的细胞包括 CHO 细胞和 COS 细胞。CHO 细胞属于成纤维细胞,很少分泌自身的内源蛋白,利于外源蛋白的表达。徐建华等^[24]将扩增得到家蝇 Cecropin 和 Attacin 基因构建于真核表达载体 pcDNA3.1(+)中,转染至 CHO 细胞中并成功获得表达。COS 细胞是进行外源基因瞬时表达时用途最广的宿主,其重组载体易于组建,对插入 DNA 的量没有限制。金小宝等^[25-26]将家蝇抗菌肽 Defensin 和 Cecropin 基因与表达载体 pcDNA3.1(+)连接,构建重组表达质粒,在非洲绿猴肾细胞株 COS-7 中进行了表达,表达产物在细胞上清液中。

抗菌肽基因在真核表达系统中,多数都实现目的基因的表达,且产物未对工程菌产生明显的抑制作用,这表明多数抗菌肽对真核细胞的毒性较小,更有利于抗菌肽的表达,因此利用真核表达系统来表达抗菌肽基因具有广泛的应用前景。

3 家蝇基因工程抗菌肽的生物活性

家蝇抗菌肽不仅具有广谱抗细菌作用,还具有抗真菌、抗病毒、抗肿瘤细胞以及抗寄生虫等生物活性。但通过基因工程获得的家蝇抗菌肽多数是抗细菌作用的报道。

徐建华^[18]、金小宝^[22]、李小波^[23]、Xueli Zheng 等^[12]获得的家蝇抗菌肽 Attacin、Cecropin 和 Defensin 基因的表达产物对大肠杆菌均具有抗菌活性。金丰良^[20]、仇妍虹^[21]等将获得表达的家蝇抗菌肽 Defensin 基因进行抑菌试验,其对金黄色葡萄球菌有较好的抑菌活性。Qian Ren 等^[27]表达的鸡型家蝇溶菌酶基因(Mdlys)的重组蛋白对革兰氏阳性和革兰氏阴性菌都具有体外抑菌活性。赵平森等^[17]采用抑菌圈法检测家蝇 cecropin 表达的蛋白对大肠杆菌、沙门氏菌和停乳链球菌的生长均有抑制作用。刘变芳等^[13]研究得到的果蝇抗菌肽 Andropin 的全基因序列的表达产物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有抑制作用。

4 展望

在当前许多细菌产生耐药性、开发新型抗生素困难的形势下,对家蝇抗菌活性物质的研究在农业、医药、食品等领域具有重要的意义。如何提高

家蝇抗菌肽的生产效率及降低成本是目前亟待解决的问题。利用基因工程技术获得家蝇抗菌肽成本低、操作简便、生产周期短,有望成为解决这些难题的有效办法。但通过基因工程技术制备家蝇抗菌肽仍存在许多问题,如对表达宿主存在毒性,易被蛋白酶水解,常形成包涵体而影响表达蛋白的生物活性及构像,分子大且具有抗原性,难于分离、纯化等。然而,随着分子生物学的发展和对抗菌肽研究的不断深入,这些难题都将解决。总之,家蝇作为抗菌肽的直接来源有着广阔的开发利用价值,也将会被广泛的应用于兽医临床。

参考文献:

- [1] Kamysz W, Turecka K. Antimicrobial preservative effectiveness of natural peptide antibiotics[J]. Acta Pol Pharm, 2005, 62(5): 341-344.
- [2] Boman H G, Nissson I, Rasmuson B. Inducible antibacterial defense system in *Drosophila*[J]. Nature, 1972, 237(5352): 232-235.
- [3] Rahuma N, Ghenghesh K S, Ben Aissa R, *et al.* Carriage by the housefly (*Musca domestica*) of multiple - antibiotic - resistant bacteria that are potentially pathogenic to humans, in hospital and other urban environments in Misurata, Libya[J]. Ann Trop Med Parasitol, 2005, 99(8): 795-802.
- [4] Sophia E, Dan H. *Drosophila* cecropin as an antifungal agent[J]. Insect Biochem Mol Bio, 1999, 29(11): 965-972.
- [5] 冯志国, 刘慧娟, 陆 婕, 等. 一新富含甘氨酸果蝇抗菌肽在大肠杆菌中的优化表达[J]. 生物技术, 2008, 18(4): 18-20.
- [6] Bonmatin J M, Bonnat J L, Gallet X, *et al.* Two - dimensional ¹H NMR study of recombinant insect defensin a in water: resonance assignments, secondary structure and global folding[J]. Biomol NMR, 1992, 2(3): 235-256.
- [7] 徐恒卫, 孙 兰, 刘景生. 富含脯氨酸的抗菌肽研究进展[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(7): 735-740.
- [8] 金小宝, 朱家勇. 家蝇幼虫差异表达基因的克隆筛选与分析[J]. 生物技术, 2005, 15(2): 527.
- [9] 刘雷山, 金小宝, 朱家勇, 等. 基因芯片技术筛选家蝇抗菌肽相关基因[J]. 生物工程学报, 2008, 24(7): 1300-1305.
- [10] 李殿香, 康翠洁, 张 伟, 等. 家蝇幼虫消减文库的构建及差异表达基因的鉴定[J]. 昆虫学报, 2010, 53(6): 601-610.
- [11] 国 果, 吴建伟, 吴沁怡, 等. 家蝇几丁质酶基因的序列分析、克隆和诱导表达[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(6): 570-573.
- [12] Xueli Zheng, Wei Wang. High - level expression of housefly cecropin A in *Escherichia coli* using a fusion protein[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2010, 3(6): 421-426.
- [13] 刘变芳, 郭蔼光, 金伟波, 等. 果蝇抗菌肽基因(*Andropin*)的原核表达与活性分析[J]. 西北农林科技大学学报, 2010, 38(7): 209-215.
- [14] 郑 立, 李 娟, 郭亚伟, 等. 家蝇溶菌酶 2 基因的克隆及其性质研究[J]. 四川动物, 2011, 30(5): 705-710.
- [15] 王来城, 王金星, 赵小凡, 等. 家蝇防御素在大肠杆菌中的表达、纯化与抗体制备[J]. 动物学报, 2005, 51(2): 327-334.
- [16] 许琴英, 朱家勇. 家蝇幼虫 Defensin 成熟蛋白序列的克隆及在原核中的表达[J]. 中国热带医学, 2005, 5(1): 4-6.
- [17] 赵平森, 姜 宁, 张爱忠. 家蝇抗菌肽 Cec Md 的高效表达、纯化及其活性的研究[C]//资源开发与利用, 2010: 133.
- [18] 徐建华, 朱家勇, 金小宝, 等. 家蝇幼虫抗菌肽 Attacin 基因的克隆表达及抑菌生物学活性[J]. 医学分子生物学杂志, 2007, 4(1): 20-26.
- [19] 杨小蓉, 金小宝, 丁彩屏, 等. 家蝇幼虫抗菌肽 diptericin_2 基因的克隆及原核表达 - 鉴定[J]. 现代预防医学, 2012, 39(11): 2791-2793.
- [20] 金丰良, 许小霞, 赵士炜, 等. 家蝇防御素 Defensin cDNA 的克隆及在毕赤酵母中的表达[J]. 中山大学学报, 2006, 45(3): 86-89.
- [21] 仇妍虹, 李 鹏, 李 斐, 等. 重组家蝇抗菌肽 Des - HF 在酵母中的表达及对金黄色葡萄球菌的抗菌活性[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(1): 105-109.
- [22] 金小宝, 王婷婷, 朱家勇, 等. 家蝇抗菌肽 Defensin 在毕赤酵母中的表达及活性鉴定[J]. 生物技术通报, 2010, (9): 194-197.
- [23] 李小波, 王婷婷, 朱家勇, 等. 家蝇抗菌肽 Attacin 在毕赤酵母中的异源表达[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2010, 28(5): 332-336.
- [24] 徐建华, 朱家勇, 金小宝, 等. 抗菌肽 Cecropin - His - 6 基因的真核表达及其生物活性研究[J]. 中国热带医学, 2006, 6(7): 1119-1121.
- [25] 金小宝, 朱家勇, 马 艳, 等. 家蝇抗菌肽 Defensin 基因在 COS - 7 细胞中的瞬时表达[J]. 生物技术, 2006, 16(4): 10-11.
- [26] 金小宝, 朱家勇, 马 艳, 等. 家蝇抗菌肽基因 Cecropin 在 COS - 7 细胞中的表达及产物活性初步研究[J]. 中国人兽共患病, 2007, 23(6): 566-568.
- [27] Qian Ren, Xiaofan Zhao, Jinxing Wang. Molecular characterization and expression analysis of a chicken - type lysozyme gene from housefly (*Musca domestica*) [J]. Journal of Genetics and Genomics, 2009, 36(1): 7-16.

(责任编辑:李文平)