【生物工程 / Bioengineering】

斑节对虾 *carcininPm3* 的表达及其无标签多肽的获得

李国强, 周 亮, 李安国, 王潮岗

深圳大学生命与海洋科学学院, 深圳市海洋生物资源与生态环境重点实验室,
广东省海洋藻类开发与应用工程重点实验室, 广东深圳 518060

摘 要: crustin 是对虾中重要的抗菌肽, 本研究获得的 *carcininPm3* 属于斑节对虾 crustin 家族, 是一种新型抗菌肽, 成熟肽含有 92 个氨基酸, 与其他对虾抗菌肽的同源性小于 45%。根据其氨基酸序列和大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 的密码子偏好性设计 *carcininPm3* 的基因序列, 将 *carcininPm3* 连接到原核表达载体 pSmartI-SUMO 上, 构建重组表达载体 pSmartI-SUMO-*carcininPm3*, 再转化至原核表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 通过异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导 SUMO-*carcininPm3* 的融合表达, 进一步优化其表达条件, 获得表达量大、可溶性高的重组蛋白。通过亲和层析纯化得到重组蛋白, 蛋白的质量浓度达到 195 μg/mL。利用 SUMO 酶去除 SUMO 融合标签, 获得没有外源标签的 *carcininPm3* 抗菌肽, 可用于蛋白功能分析、抗体制备等研究。研究结果为 *carcininPm3* 功能的分析及应用提供参考。

关键词: 基因工程; 斑节对虾; 抗菌肽; crustin 家族; *carcininPm3* 基因; 原核表达; 重组蛋白; 亲和层析

中图分类号: Q812

文献标志码: A

doi: 10.3724/SP.J.1249.2020.01009

Expression of tag-free *carcininPm3* of *Penaeus monodon*

LI Guoqiang, ZHOU Liang, LI Anguo, and WANG Chaogang

College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen Key Laboratory of Marine Bioresources and Ecology,
Guangdong Technology Research Center for Marine Algal Bioengineering,
Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong Province, P. R. China

Abstract: Crustins are one of the vital antimicrobial peptides in shrimp. *CarcininPm3*, as one of the members of the crustin family, contained 92 amino acids in its mature peptide. It is a novel antimicrobial peptide in shrimp because of only 45% homology to other species. In this paper, firstly, sequence of *carcininPm3* was redesigned according to its mature peptide sequence and codon bias of *Escherichia coli* (*E. coli*), and then inserted into pSmartI-SUMO vector to finally obtain pSmartI-SUMO-*carcininPm3* recombinant plasmid. This plasmid was introduced into *E. coli* BL21 (DE3) and the transformants were capable to express SUMO-*carcininPm3* in fusion form when induced by IPTG. Further studies were proceeded to optimize the expression of SUMO-*carcininPm3*, acquiring recombinant protein with large quantity and high solubility. Finally, this recombinant protein was purified by affinity chromatography

Received: 2018-11-28; **Accepted:** 2019-01-23

Foundation: National Natural Science Foundation of China (31470389); Shenzhen Science and Technology Plan (JCYJ20160422171614147, JCYJ20170818101523761, JCYJ20170302144605664)

Corresponding author: Associated professor WANG Chaogang. E-mail: charlesw@szu.edu.cn

Citation: LI Guoqiang, ZHOU Liang, LI Anguo, et al. Expression of tag-free *carcininPm3* of *Penaeus monodon* [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2020, 37(1): 9-16. (in Chinese)

<http://journal.szu.edu.cn>

and the content was up to 195 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After treated with SUMO protease, the SUMO tag was removed and tag-free carcininPm3 peptide was obtained. The above results provide a foundation to the functional analysis and application of carcininPm3.

Key words: genetic engineering; *Penaeus monodon*; antimicrobial peptide; family crustin; carcininPm3; prokaryotic expression; recombination protein; affinity chromatography

抗菌肽是一种由生物防御系统产生的对抗外源性病原体的小分子肽类物质,是体液免疫中的一种重要因子,具有广谱的抗菌活性^[1],被认为是一种天然抗生素.与传统抗生素相比,抗菌肽的长期使用不会产生耐药性^[2],可激活生物体内的免疫系统,参与细胞信号的传导,具有抗肿瘤、抗病毒和抗寄生虫^[3]等功能,是最有希望成为替代抗生素的新型抗菌药物.据报导,目前已发现超过 2 960 种抗菌肽,其中,2 184 种来自动物^[4],而在对虾中的抗菌肽主要有:对虾素 (penaeidins)、甲壳肽 (crustins) 和抗脂多糖因子 (anti-lipopolysaccharide factors, ALFs) 等^[5-7].对虾素家族有富含脯氨酸的 N 端,且在 C 端含有 6 个半胱氨酸残基,已从凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 与白滨对虾 (*Litopenaeus setiferus*) 等多种对虾中分离出来. ALFs 在中国鲎 (*Tachypleus tridentatus*) 血细胞中首次被分离出来,这是一种含两个半胱氨酸形成二硫键的碱性蛋白,其氨基末端为焦谷氨酸,含有一个脂多糖结构域 (lipopolysaccharide binding domain, LBD)^[8],对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有抗菌活性. crustin 是无脊椎动物中最大抗菌肽家族之一,富含半胱氨酸.甲壳类中共有 4 种蛋白类型^[9]. I 型 crustin 主要存在于蟹和龙虾等生物,由一个信号肽、富含半胱氨酸的结构域和 C 末端的单个乳清酸性蛋白 (whey acidic protein, WAP) 结构域构成. II 型 crustin 主要存在于对虾中,除富含半胱氨酸外,在 N 末端含有一个富含甘氨酸的区域. III 型 crustin 也称为含有单一 WAP 结构域蛋白质,在 WAP 结构域前有富含脯氨酸和精氨酸的区域^[10-11]. IV 型 crustin 是含有 2 个 WAP 结构域的蛋白^[11].以上 4 种类型的 crustin 在斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 均有发现:属于 I 型 crustin 的蛋白有 2 种;属于 II 型 crustin 的蛋白至少有 10 多种^[12],其中,crustinPm1 和 crustinPm5 仅对革兰氏阳性菌表现出抗菌活性,而 crustinPm7 革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌具有活性^[13-15];属于 III 型 crustin 的蛋白有 3 种,对革兰氏阳性菌有抑制功能,但对革兰氏阴性菌无效,且是枯草杆菌蛋白酶 A 的竞争性抑制

剂^[16];属于 IV 型 crustin 的蛋白有 1 种,但未表现出明显的抑菌活性^[17].

抗菌肽是无脊椎动物免疫系统的重要成分,但其在生物体内的含量比较低.可利用基因工程技术在大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 中进行大量表达,研究其抗菌功能.由于抗菌肽对细菌和真菌等具有抑杀作用,很多抗菌肽的异源表达并不成功,即使获得了表达,也易形成包涵体.此外,原核表达系统为了便于纯化,往往带有标签,这会影响蛋白的正确折叠和抗体的制备等.因此,如何使抗菌肽实现高表达、高活性且不带外源标签,是目前抗菌肽表达及功能研究的难点.本研究通过比对转录组测序及抗菌肽数据库,获得 carcininPm3 的基因序列,与类泛素蛋白修饰分子 (small ubiquitin-like modifier, SUMO) 在大肠杆菌中融合表达,获得无外源标签的 carcininPm3 抗菌肽,为后续的功能分析及应用提供基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

E. coli BL21 (DE3) 购自上海唯地生物技术有限公司; pSmartI-SUMO 载体购于通用生物系统 (安徽) 有限公司.

1.1.2 主要试剂及酶

主要试剂和酶有: Amp、Kana、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)、考马斯亮蓝、Tris、NaCl 和咪唑 (imidazole). 质粒提取试剂盒购自 Takara (北京) 公司; Direct-load™ Color Prestain Protein Marker (10 ~ 180 kDa, 1 Da = 1 u) 购自广州市康润生物科技有限公司; 5 × 蛋白上样缓冲液、Broadford 试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司.

1.2 carcininPm3 基因的合成和载体的构建

将 carcininPm3 的成熟肽与具有 His 标签的 SUMO 蛋白 C 末端融合,并在 *E. coli* BL21 (DE3) 中进行原核表达. carcininPm3 的核苷酸序列在两端具

有 *SacI* 和 *XhoI* 酶切位点,可根据大肠杆菌密码子偏好性优化其密码子,然后交由通用生物系统(安徽)有限公司通过化学合成方法合成基因,最后通过 *SacI* 和 *XhoI* 酶切位点将合成的 DNA 与 pSmartI-SUMO 载体连接,得到重组质粒,命名为 pSmartI-SUMO-*carcininPm3*。

1.3 重组蛋白的诱导表达及可溶性分析

利用质粒提取试剂盒提取重组表达载体 pSmartI-SUMO-*carcininPm3*,采用热激法转化至 *E. coli* BL21 (DE3)中,获得单克隆菌落。按照以下的步骤进行诱导表达:①挑取阳性单克隆菌落接种于含卡那霉素的 LB 培养基中,于 37 °C 以 200 r/min 振荡菌液,培养过夜;②次日将过夜培养的菌液按体积比 1:100 加到新鲜的 LB 培养基中,于 37 °C 以 200 r/min 振荡菌液,培养菌液至光密度 $D(600) \approx 0.6$,加入 IPTG 使其终浓度为 1.0 mmol/L,在加入 IPTG 诱导前取 1 mL 菌液作为对照;③在 37 °C 以 200 r/min 振荡菌液,继续诱导 6 h;④诱导完毕后,取 1 mL 诱导后的菌液,剩余的菌液以 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,加入平衡缓冲液(50 mmol/L Tris, 200 mmol/L NaCl, pH=8.0)重悬菌体,超声破碎菌体 40 min(功率为 195 W,超声 2 s,停顿 4 s),于 4 °C 以 10 000 r/min 离心 30 min 后分离出上清与沉淀;⑤取诱导前菌液、诱导 6 h 的菌液、破碎菌液后的上清和破碎菌液后的沉淀,分别加入 5 × 蛋白上样缓冲液,100 °C 煮沸 10 min,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳检测蛋白表达及其可溶性的情况。

1.4 原核表达条件的优化

进行原核表达时,影响蛋白表达量的条件主要是诱导时间和 IPTG 浓度,为获得大量蛋白,需对蛋白表达的诱导时间和 IPTG 浓度进行优化。时间梯度设为 0、1.5、3.0、4.5、6.0 和 7.5 h;IPTG 终浓度的梯度为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L。按照 1.3 节方法进行诱导,通过 SDS-PAGE 检测蛋白表达情况,最终确定表达的最佳条件。

1.5 *carcininPm3* 蛋白的分离纯化

按照 1.3 节方法收集菌体,取 100 mL 培养物的菌体沉淀,加入 4 mL 平衡缓冲液(50 mmol/L Tris、200 mmol/L NaCl, pH=8.0)重悬菌体,超声破碎后收集上清,并用孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤。上清液中的 His-SUMO-*carcininPm3* 融合蛋白通过镍柱

亲和层析进行分离纯化。先用平衡缓冲液(50 mmol/L Tris, 200 mmol/L NaCl, pH=8.0)平衡柱子,并调 0,待吸收峰稳定后上蛋白样品,待流出峰经过,吸收峰下降并稳定后用洗脱液(50 mmol/L Tris, 200 mmol/L NaCl, 60 mmol/L imidazole, pH=8.0)洗脱未结合蛋白;然后,换收集液 1(50 mmol/L Tris, 200 mmol/L NaCl, 200 mmol/L imidazole, pH=8.0)洗脱并收集样品;最后,用收集液 2(50 mmol/L Tris, 200 mmol/L NaCl, 500 mmol/L imidazole, pH=8.0)洗脱并收集样品。收集好的样品经 SDS-PAGE 电泳检测蛋白纯化结果。

1.6 蛋白浓度的测定

将过柱纯化后获得的融合蛋白溶液装入透析袋,浸泡在平衡缓冲液(50 mmol/L Tris, 200 mmol/L NaCl, pH=8.0)中,于 4 °C 透析 16 h,以去除蛋白溶液中的咪唑。根据 Bradford 试剂盒说明书制作蛋白标准曲线,利用多功能酶标仪测定融合蛋白光密度 $D(595)$,再根据 $D(595)$ 的值与标准曲线,计算出融合蛋白浓度,最后将蛋白溶液分装并进行真空干燥,获得蛋白粉末存于 -80 °C。

1.7 SUMO 融合标签的分离

由于 SUMO 标签相对分子质量大,可能影响 *carcininPm3* 蛋白功能,所以利用 SUMO 酶(购自通用生物系统(安徽)有限公司)将 SUMO 融合标签与 *carcininPm3* 蛋白切割分离,获得不带标签的目的蛋白 *carcininPm3*。为能完全去除 SUMO 标签,取相同质量的融合蛋白 *carcininPm3*,分别加入不同量的 SUMO 酶,于 4 °C 酶切 16 h,SDS-PAGE 检测酶切结果,最终确定 SUMO 酶与融合蛋白的最佳切割质量比例。

1.8 利用 LC-MS 鉴定 *carcininPm3*

将 SDS-PAGE 凝胶电泳得到的 *carcininPm3* 蛋白条带进行切胶,并放置于 1.5 mL EP 离心管中,加入体积分数为 50% 的乙腈,于 37 °C 以 200 r/min 振荡脱色过夜;用纯乙腈使胶体变白变硬,弃上清,加入胰酶酶解,再加入覆盖液(碳酸氢铵)于 37 °C 水浴 16 h;经胰酶酶解后转至新的 1.5 mL EP 离心管,加入萃取液(水和无水乙腈按照体积比 1:4 混合后,加入总体积 0.5% 的甲酸),超声 10 min,离心,再将萃取液真空干燥 4 h 得到蛋白粉末;用上样液(水和无水乙腈按照体积比 1:49 混合后,再加入总体积 0.5% 的甲酸)溶解蛋白粉末,涡旋振荡后 13 000g 室温下离心 15 min,最后利用液相色谱-质谱联用仪(liquid chromatograph mass

spectrometer, LC-MS) 鉴定 *carcininPm3* 蛋白。

2 结果与分析

2.1 获得 *carcininPm3* 原核表达载体

carcininPm3 成熟肽的氨基酸序列为: APQSSV LLPTVPVPCSRWCHHDVDGYLYCCQEEQGVGAHSGK CPDTPIQPHEQNILDTKGGGALHCERDGDCAKNQKC CYTKFRQQRICRNV, 它是一类新型的对虾抗菌肽, 仅与南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 有较高同源性 (88%), 与日本囊对虾 (*Penaeus japonicus*) 等物种的同源性都低于 45%。*carcininPm3* 蛋白的分子质量为 10.2 kDa, 等电点 (isoelectric point, pI) 值为 7.09。根据大肠杆菌密码子合成 *carcininPm3* 成熟肽的基因序列, 最终连接到 pSmartI-SUMO 载体的 *SacI* 和 *XhoI* 上, 与载体上的 SUMO 的蛋白 C 末端融合, 获得 pSmartI-SUMO-*carcininPm3* 表达载体 (图 1)。

图 1 重组质粒的构建

Fig. 1 (Color online) Construction of recombination plasmid

2.2 *carcininPm3* 的表达及可溶性检测

将正确的重组质粒转入 *E. coli* BL21 (DE3) 进行表达, 并对 *carcininPm3* 的可溶性进行检测, 结果如图 2。由图 2 可见, 诱导 6 h 后融合蛋白 *carcininPm3* 得以正常表达, 分子质量约为 25 kDa, 并且存在于上清中, 表明融合蛋白 *carcininPm3* 是

<http://journal.szu.edu.cn>

图 2 *carcininPm3* 的原核表达及可溶性分析
Fig. 2 Heterologous expression of *carcininPm3* and its solubility analysis

可溶性蛋白。

2.3 获得 *carcininPm3* 最优表达条件

图 3 为 *carcininPm3* 原核表达及可溶性分析结果。由图 3 可见, 在 1 mmol/L 的 IPTG 诱导下, 融合蛋白 *carcininPm3* 的表达量逐渐增大, 6 h 及之后的表达量接近。图 4 的电泳结果显示, 在不同终浓度 IPTG 条件下诱导 6 h, 0.2、0.8 和 1.0 mmol/L 诱导蛋白的表达量相差不大, 又因 IPTG 具有毒性, 会危害表达宿主, 所以选择 IPTG 终浓度为 0.2 mmol/L。因此, 可确定融合蛋白 *carcininPm3* 的在 IPTG 终浓度为 0.2 mmol/L 条件下诱导 6 h 表达量

M 为蛋白质分子量标准; 1 为未加 IPTG 诱导剂; 2~6 分别为 1.0 mmol/L IPTG 诱导 1.5、3、4.5、6 和 7.5 h

图 3 *carcininPm3* 原核表达的时间优化

Fig. 3 Optimization of induction time for *carcininPm3* expression

图4 *carcininPm3* 原核表达的 IPTG 浓度优化
Fig. 4 Optimization of IPTG concentration for *carcininPm3* expression

最大。

2.4 *carcininPm3* 的分离纯化

将重组菌破碎后的上清先过滤去除杂质, 再上亲和层析柱进行纯化, 经过杂蛋白洗脱、目的蛋白收集、透析和 SDS-PAGE 电泳检测等步骤获得目的蛋白。由图5可见, 收集到的融合蛋白在 25 kDa 附近有一清晰条带, 说明用 200 mmol/L 和 500 mmol/L 咪唑均能收集到目的蛋白。

图5 *carcininPm3* 蛋白的分离纯化
Fig. 5 Purification of *carcininPm3*

2.5 融合蛋白 *carcininPm3* 浓度测定

用 Bradford 法对纯化和透析后的融合蛋白 *carcininPm3* 进行质量浓度测定, 测得质量浓度为 195 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。随后将蛋白溶液分装成 10 mL/管, 通过冷冻真空干燥获得蛋白粉末, 于 -80°C 存储备用。

2.6 tag-free 抗菌肽的获得

SUMO 蛋白酶是一种具有较高活性的半胱氨酸蛋白酶, 仅识别 SUMO 蛋白的 3 级结构。在双 Gly 残基 C 端精确切割, 能高效且特异地将 SUMO 蛋白从重组蛋白上切割下来, 从而获得目的蛋白, 图

6 (a) 为 SUMO 蛋白酶酶切示意图。

取 1 管融合蛋白 *carcininPm3* 冻干粉, 加入超纯水, 溶解至质量浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。取 5 个 1.5 mL 离心管, 分别标号 1、2、3、4 和 5, 每个 EP 管都加入 50 μg *carcininPm3* 蛋白, 然后分别加入 0.5、1.0、1.5 和 2.0 U (1 U = 16.67 nmol/s = 16.67 nkatal) 的 SUMO 酶, 于 4°C 酶切 16 h。图 6 (b) 为切除 SUMO 的蛋白电泳图。结果显示, 50 μg 带有 SUMO 标签的融合蛋白只需要 0.5 U 的 SUMO 酶就能除去 SUMO 标签。经过 SUMO 酶切割, 获得去除 SUMO 蛋白的抗菌肽, 该抗菌肽是 tag-free 多肽, 无外源氨基酸, 不影响多肽的正确折叠, 分子质量为 10.2 kDa, 符合预期。最终, 确定 1 U SUMO 酶能有效切割 100 μg 融合蛋白。

(a) SUMO 蛋白酶酶切示意图

(b) 切除 SUMO 的蛋白电泳图

M为蛋白质分子量标准; 1为酶切前的 *carcininPm3*;
2~5分别为加入 0.5、1.0、1.5 和 2.0 U SUMO 酶; 6为 SUMO 酶

图6 SUMO 融合标签的分离
Fig. 6 Cleavage of SUMO tag

2.7 确认 *carcininPm3* 蛋白的表达

通过 LC-MS 鉴定目的蛋白, 利用 Mascot 软件与已知 *carcininPm3* 的氨基酸序列进行比对。由图 7 可见, 共检测到两条肽段, 氨基酸序列覆盖率达到

Protein sequence coverage: 36%
Matched peptides shown in **bold red**.
1 **APQSSVLLPT** **PVPSCSR**WCH HDVDGYLYCC QEEQGVGAHS CK**CPDTPIQP**
51 **HEQNILD**TKG GGALHCERDG DCAKNQKCCY TKFRQQRICR NV

图7 *carcininPm3* 蛋白的质谱鉴定

Fig. 7 (Color online) The mass spectrum analysis of *carcininPm3*

36%，方框里是质谱鉴定到的氨基酸，检测到的氨基酸序列是目的蛋白 N 端的 17 个氨基酸和中间肽段的 17 个氨基酸，表明原核表达获得了融合蛋白，成功通过 SUMO 酶切除标签，获得没有外源氨基酸的 *carcininPm3* 蛋白。

3 讨 论

如今抗生素滥用日趋严重，已产生了越来越多的耐药性菌株，严重威胁人类健康^[18]。绿色、环保的抗菌肽是替代抗生素的最佳选择，在养殖业尤其是水产养殖中具有重要的开发潜力。然而，天然的抗菌肽广泛存在于动植物体内，含量少且提取难度大。虽然可通过化学合成抗菌肽，但步骤复杂且成本昂贵。所以，利用基因工程技术获得抗菌肽是最佳选择，它成本低廉、操作简便且易于规模化生产，具有广阔的应用前景^[19-20]。

抗菌肽最成功的表达系统是大肠杆菌表达系统。但是，表达抗菌肽往往对其本身产生毒性且会

将其杀死^[21]，导致表达失败。大肠杆菌表达量大，且易形成包涵体，需通过复杂的复性过程才能获得有活性蛋白^[22]。因此，采取与可溶性高的蛋白一起融合表达，更容易获得高活性的蛋白。作为蛋白融合表达的标签有很多，SUMO 因其可作为分子伴侣，高重组蛋白的表达量，促进蛋白的正确折叠，且其分子量小，方便切割，且不影响多肽序列和活性，被广泛用于融合蛋白的表达^[23]。抗菌肽的异源表达往往带有各种标签（表 1），能促进可溶表达或方便纯化^[24-26]，但也会影响抗菌肽的正确折叠，不利于抗体的制备，影响抗菌活性等。抗菌肽一般仅有 15 ~ 50 个氨基酸，几个外源氨基酸的存在也可能影响其功能^[27]。因此，获得无外源氨基酸的“纯净”抗菌肽对其功能研究意义重大。本研究通过利用 SUMO 酶切除了带有组氨酸标签的 SUMO 蛋白，获得了无外源氨基酸的抗菌肽。该技术既能实现目的蛋白的高表达，又能最终获得“纯净”的抗菌肽，可为进一步研究该抗菌肽的功能提供可靠的活性蛋白。

表 1 非 tag-free 抗菌肽表达的分析
Table 1 Analysis of none tag-free antimicrobial peptides

抗菌肽名称	表达载体	融合标签	是否可溶	是否切除	文献
G13	pThiohisA	His-Patch thioredoxin	是	否	[19]
A20L	pET-28a	His-SUMO	是	否	[20]
抗菌肽 A-蜂毒素	pIN-III · OmpA2	His-OmpA2	是	否	[23]
Dermadistinctin-K	pET-32a(+)	His	是	否	[25]
Diptericin	pGEX-4T-1	His-GST	是	否	[26]
MdDpt I	pET-28a	His	是	否	[27]
Crustin	pET-32a(+)	His	是	否	[28]

抗菌肽富含疏水性氨基酸，原核表达往往容易形成包涵体^[28]，本研究通过优化表达条件获得了可溶性蛋白。然而，无论是融合表达的抗菌肽还是切除融合标签的抗菌肽，均未能对金黄葡萄球菌和溶藻弧菌等产生显著抑杀效果，仅对副溶血弧菌和嗜水气单胞菌等有一定的抑制作用。抗菌肽往往具有 α -螺旋和 β -折叠， α -螺旋富于疏水性的 C 端往往插入细胞膜中， β -折叠则需要二硫键来维系其稳定性。影响抗菌肽抗菌活性的主要因素包括疏水

性、两亲性、螺旋度和正电荷数等^[29]。虽然原核表达系统得到的蛋白量大，但较难得到正确折叠的产物，因此也能影响蛋白活性。下一步将利用本实验室建立的莱茵衣藻表达系统表达抗菌肽，有助于蛋白形成正确的结构，以获得高活性的抗菌肽。

结 语

本研究利用 SUMO 融合表达技术，在 *E. coli*

成功表达了源于斑节对虾的抗菌肽 *carcininPm3*, 经过镍柱亲和层析纯化获得大量且纯度较高的重组蛋白, 通过 SUMO 酶酶切和分离后, 可获得高纯度的 tag-free 抗菌肽分子, 为 *carcininPm3* 的功能研究和应用奠定了基础。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31470389); 深圳市科技计划资助项目 (JCYJ20160422171614147, JCYJ20170818101523761, JCYJ20170302144605664)

作者简介: 李国强 (1993—) 男, 深圳大学硕士研究生。研究方向: 水生生物学。E-mail: 504493562@qq.com

引文: 李国强, 周亮, 李安国, 等. 斑节对虾 *carcininPm3* 的表达及其无标签多肽的获得[J]. 深圳大学学报理工版, 2020, 37(1): 9-16.

参考文献 / References:

- [1] ZHANG Lingjuan, GALLO R L. Antimicrobial peptides [J]. *Current Biology*, 2016, 26(1): R14-R19.
- [2] BULET P, STÖCKLIN R, MENIN L. Anti-microbial peptides; from invertebrates to vertebrates [J]. *Immunological Reviews*, 2010, 198(1): 169-184.
- [3] LI Yanmei, XIANG Qi, ZHANG Qi, et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application [J]. *Peptides*, 2012, 37(2): 207-215.
- [4] MORAVEJ H, MORAVEJ Z, YAZDANPARAST M, et al. Antimicrobial peptides: features, action, and their resistance mechanisms in bacteria [J]. *Microbial Drug Resistance*, 2018, 24(6): 747-767.
- [5] TASSANAKAJON A, RIMPHANITCHAYAKIT V, VISETNAN S, et al. Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 80: 81-93.
- [6] TASSANAKAJON A, SOMBOONWIWAT K, SUPUNGUL P, et al. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(4): 954-967.
- [7] DESTOUMIEUX-GARZÓN D, ROSA R D, SCHMITT P, et al. Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2016, 371 (1695): 20150300.
- [8] HOESS A, WATSON S, SIBER G R, et al. Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, *Limulus* anti-LPS factor, at 1.5 Å resolution [J]. *The EMBO Journal*, 1993, 12(9): 3351-3356.
- [9] TASSANAKAJON A, SOMBOONWIWAT K, AMPARYUP P. Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2015, 48(2): 324-341.
- [10] SMITH V J, FERNANDES J M, KEMP G D, et al. Crustins: enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, 32(7): 758-772.
- [11] SMITH V J. Phylogeny of whey acidic protein (WAP) four-disulfide core proteins and their role in lower vertebrates and invertebrates [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2011, 39(5): 1403-1408.
- [12] DONPUDSA S, VISETNAN S, SUPUNGUL P, et al. Type I and type II crustins from *Penaeus monodon*, genetic variation and antimicrobial activity of the most abundant crustin *Pm4* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 47(1): 95-103.
- [13] KRUSONG K, POOLPIPAT P, SUPUNGUL P, et al. A comparative study of antimicrobial properties of crustin *Pm1* and crustin *Pm7* from the black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 36(1): 208-215.
- [14] ARAYAMETHAKORN S, SUPUNGUL P, TASSANAKAJON A, et al. Characterization of molecular properties and regulatory pathways of Crustin *Pm1* and Crustin *Pm7* from the black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2017, 67: 18-29.
- [15] VATANAVICHARN T, SUPUNGUL P, PUANGLARP N, et al. Genomic structure, expression pattern and functional characterization of crustin *Pm5*, a unique isoform of crustin from *Penaeus monodon* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 153(3): 244-252.
- [16] AMPARYUP P, DONPUDSA S, TASSANAKAJON A. Shrimp single WAP domain (SWD)-containing protein exhibits proteinase inhibitory and antimicrobial activities [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(12): 1497-1509.
- [17] SUTHIANTHONG P, PULSOOK N, SUPUNGUL P, et al. A double WAP domain-containing protein *PmDWD* from the black tiger shrimp *Penaeus monodon* is involved in the controlling of proteinase activities in lymphoid organ [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(3): 783-790.
- [18] THEURETZBACHER U. Global antibacterial resistance: the never-ending story [J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2013, 1(2): 63-69.
- [19] CHE Yuanyuan, LU Yinghu, ZHA Xiangdong, et al.

- Higher efficiency soluble prokaryotic expression, purification, and structural analysis of antimicrobial peptide G13 [J]. *Protein Expression and Purification*, 2016, 119: 45-50.
- [20] YI Tonghui, SUN Shiyu, HUANG Yibing, et al. Prokaryotic expression and mechanism of action of α -helical antimicrobial peptide A20L using fusion tags [J]. *BMC Biotechnology*, 2015, 15(1): 69.
- [21] 蔡 灿, 薛良义, 孙爱飞. 大黄鱼肝表达抗菌肽 2 基因的克隆和原核表达[J]. *生物学杂志*, 2012, 29(4): 55-59.
- CAI Can, XUE Liangyi, SUN Aifei. Cloning and prokaryotic expression of liver-expressed antimicrobial peptide-2 gene from *Larimichthys crocea* [J]. *Journal of Biology*, 2012, 29(4): 55-25. (in Chinese)
- [22] 付明娟, 林接玉, 谢捷明. 包涵体蛋白复性的研究进展[J]. *医学综述*, 2015, 21(20): 3657-3659.
- FU Mingjuan, LIN Jieyu, XIE Jieming, et al. The research progress of inclusion body protein renaturation [J]. *Medical Recapitulate*, 2015, 21(20): 3657-3659. (in Chinese)
- [23] 钟美娟, 张华华, 项 丽, 等. SUMO-TAT-Klf4 融合蛋白的原核表达及纯化[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(3): 977-982.
- ZHONG Meijuan, ZHANG Huahua, XIANG Li, et al. Prokaryotic expression and purification of SUMO-TAT-Klf4 fusion protein [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(3): 977-982. (in Chinese)
- [24] 刘 诚, 黎满香, 卢 帅, 等. 抗菌肽 Dermadistinctin-K 的原核表达及生物活性鉴定[J]. *中国兽医科学*, 2012, 42(5): 517-522.
- LIU Cheng, LI Manxiang, LU Shuai, et al. Prokaryotic expression and biological activity of antibacterial peptide Dermadistinctin-K [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2012, 42(5): 517-522. (in Chinese)
- [25] 卢 敏, 白 杰, 魏凤仙, 等. 家蝇抗菌肽 *dipteracin* 基因在大肠杆菌中的表达[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(6): 143-147.
- LU Min, BAI Jie, WEI Fengxian, et al. Expression of *dipteracin* gene from *Musca domestica* in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(6): 143-147. (in Chinese)
- [26] 孙小宁, 裴志花, 卞 路, 等. 家蝇幼虫双翅肽 *MdDpt I* 成熟肽基因的克隆与原核表达[J]. *中国兽药杂志*, 2015, 49(1): 1-5.
- SUN Xiaoning, PEI Zhihua, BIAN Lu, et al. Cloning and prokaryotic express of dipteracin I gen *MdDpt I* mature peptide chain in *Musca domestica* larvae [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2015, 49(1): 1-5. (in Chinese)
- [27] 徐栋梁, 朱超亚, 彭永鹤, 等. 黑虎虾 crustin 的克隆表达纯化及抑菌活性测定[J]. *南昌大学学报自然科学版*, 2010, 34(6): 598-602.
- XU Dongliang, ZHU Chaoya, PENG Yonghe, et al. Cloning, expression, purification and antimicrobial activity of crustin from *Penaeus monodon* [J]. *Journal of Nanchang University Natural Science*, 2010, 34(5): 598-602. (in Chinese)
- [28] KIEFHABER T, RUDOLPH R, KOHLER H H, et al. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation [J]. *Nature Biotechnology*, 1991, 9(9): 825-829.
- [29] 张海波, 金莉莉, 王秋雨. 抗菌肽活性及天然抗菌肽的改造[J]. *生命的化学*, 2011, 31(2): 227-232.
- ZHANG Haibo, JIN Lili, WANG Qiuyu. Activities of antimicrobial peptides and the reconstruction of the natural antimicrobial peptides [J]. *Chemistry of Life*, 2011, 31(2): 227-232. (in Chinese)

【中文责编: 英 子; 英文责编: 艾 琳】