



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107022549 B

(45) 授权公告日 2021.06.01

(21) 申请号 201710257611.8

(22) 申请日 2017.04.19

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107022549 A

(43) 申请公布日 2017.08.08

(73) 专利权人 华中农业大学
地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

(72) 发明人 魏开建 陈俭勇 张桂蓉 姬伟
杨瑞斌 樊启学

(74) 专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司 42104
代理人 樊戎 冯超

(51) Int. Cl.
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/46 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 105357960 A, 2016.02.24
CN 102125584 A, 2011.07.20
CN 105532642 A, 2016.05.04
CN 104293907 A, 2015.01.21
CN 101007852 A, 2007.08.01

CN 101008010 A, 2007.08.01
CN 101210243 A, 2008.07.02
WO 2020030773 A1, 2020.02.13
US 2017035763 A1, 2017.02.09
US 10077296 B2, 2018.09.18
US 10704049 B2, 2020.07.07
US 10913767 B2, 2021.02.09
US 2020297854 A1, 2020.09.24
US 2012020979 A1, 2012.01.26

周联等. “防御素与先天性免疫及获得性免疫”. 《国外医学免疫学分册》. 2005, 第28卷 (第2期),

沈文英等. “黄颡鱼抗菌肽Hepcidin基因的克隆和表达分析”. 《农业生物技术学报》. 2010, 第17卷 (第6期),

Huan Zheng等. “Molecular Characterization and Expression Analyses of the Complement Component C8 α , C8 β and C9 Genes in Yellow Catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) after the *Aeromonas hydrophila* Challenge”. 《Int. J. Mol. Sci.》. 2016, 第17卷 (第345期),

Yueju Su. “Isolation and identification of pelteobagrins, a novel antimicrobial peptide from the skin mucus of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)”. 《Comparative Biochemistry and Physiology》. 2010, (第158期),

审查员 杨兴艳

权利要求书1页 说明书9页
序列表1页 附图3页

(54) 发明名称
黄颡鱼 β 防御素基因及其 β 防御素抗菌肽及其应用

(57) 摘要
本发明公开了一种黄颡鱼 β 防御素基因及其 β 防御素抗菌肽及其应用; 本发明使用体外重组表达技术成功表达了黄颡鱼 β 防御素重组蛋

白PET-32a-Pf_BD, 且抑菌活性鉴定结果显示其对革兰氏阳性菌中的金黄色葡萄球菌, 革兰氏阴性菌中的大肠杆菌, 嗜水气单胞菌, 鮠爱德华氏菌和柱状黄杆菌均具有一定的抑菌作用。这为防御素类重组蛋白作为一种广谱抗菌药物在水产养殖中的应用奠定了基础。

1. 一种黄颡鱼 β 防御素抗菌肽在制备用于抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、嗜水气单胞菌、鮰爱德华氏菌、柱状黄杆菌的生长的药品中的应用,其中,所述 β 防御素抗菌肽的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。

黄颡鱼 β 防御素基因及其 β 防御素抗菌肽及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学技术领域,具体地指一种黄颡鱼 β 防御素基因及其 β 防御素抗菌肽及其应用。

背景技术

[0002] 黄颡鱼是我国重要的中小型淡水经济鱼类,因其无肌间刺、肉味鲜美、营养丰富而受到广大消费者的青睐,近年来成为我国水产养殖业中重要的名优养殖鱼类。2015年,我国黄颡鱼总产量达到355,725吨,在我国所有淡水鱼类产量中位居第十三位。随着市场需求量的不断增加,当前黄颡鱼的养殖规模逐年扩大,然而大规模、高密度的养殖,必然造成养殖水环境的恶化,养殖池塘中各种细菌性疾病频繁发生。尤其是黄颡鱼的红头病、腹水病、腐皮综合症等细菌性疾病以及小瓜虫感染等寄生虫病愈演愈烈,导致黄颡鱼产量降低,给黄颡鱼养殖业带来严重经济损失,制约了黄颡鱼养殖业的健康发展。在黄颡鱼等水产养殖动物细菌性疾病防治方面,目前许多养殖户仍然使用抗生素来抑制其蔓延,但长久盲目的大量使用抗生素类药物,会导致细菌耐药性的出现,甚至是“超级细菌”的产生,给鱼病的防治带来严重的影响。随着人们对水产品质量和安全性越来越关注,如何开展绿色健康水产养殖,生产出优质、安全的水产品已成为水产养殖业的发展方向。由于抗生素的过量使用及其它药物残留问题是威胁水产品质量安全的主要因素,寻找替代抗生素类的无残留的绿色药物并应用于黄颡鱼等水产养殖动物的病害防治已成为水产科学研究的热点。

[0003] 鱼类的免疫系统分为非特异性免疫和特异性免疫两种。非特异性免疫是机体抵抗病原体感染的第一道防线,这种免疫是与生俱来的,受遗传基因控制,并具有相对稳定性。鱼类作为低等脊椎动物,其特异性免疫系统和免疫反应发展不够完善,相对于高等脊椎动物而言都比较原始。因此,在鱼类受到细菌等外界病原体入侵时,非特异性免疫往往较特异性免疫发挥更大的作用。非特异性免疫包括由血细胞引起的细胞免疫和体内抗菌肽等组成的体液免疫来执行对外界病原微生物的免疫防御。而黏膜免疫又是鱼类先天性免疫的第一道防线,其重要地位不言而喻,黏膜系统主要是在对抗病原体的时候依靠机体分泌一系列的抗菌物质来抵御病原菌的入侵,其中发挥重要作用的一类抗菌物质则是抗菌肽。

[0004] 抗菌肽类是一种机体分泌的小分子类多肽,其广泛存在于各种生物体中,它们在结构和功能上十分相似,分子量一般都少于100个氨基酸,通常带正电荷,它们既参与非特异性免疫过程,又介导机体的特异性免疫反应。研究表明,抗菌肽显示出广谱抗菌活性,能够有效的抑制和杀灭细菌、真菌、病毒以及一些原生动物。它与传统的抗生素有着不同的作用机制,导致细菌不易对它产生耐药性,因此,研究抗菌肽类物质在鱼类病害防治中的作用具有十分重要的意义。防御素作为抗菌肽大家族中的重要成员,被认为是抗菌肽进化的起源,了解防御素的结构和功能,研究其在鱼类机体非特异性免疫系统,尤其是在黏膜免疫中的作用具有十分重大的意义,将为水产养殖业的健康发展奠定重要的基础。

[0005] β 防御素成熟肽是抗菌肽家族的重要成员之一,一般由个36~42个氨基酸残基组成,含有6个半胱氨酸组成的保守区域。分子间二硫键的连接方式是C1-C5、C2-C4、C3-C6,这

些二硫键形成了2对反向平行的 β 折叠片层和一个 α 螺旋,这些片层结构紧密,不容易被蛋白酶水解,从而表现出稳定活性。近年来,关于鱼类 β 防御素的研究较少,将研究成果应用于养殖生产实践的更是少之又少。如对草鱼的肠道 β 防御素的研究,虽然发现其对多种革兰氏阴性、阳性菌有抑菌作用,但仅仅作了笼统的描述,并没有深入研究该 β 防御素的不同浓度重组蛋白对不同细菌的抑菌差异性。对其它少数鱼类 β 防御素的研究也不深入,缺乏足够、可靠的重组蛋白抑菌实验和抑菌效果统计数据是目前影响鱼类 β 防御素抑菌效果评价并应用于鱼类病害防控实践的问题所在。由于不同鱼类的 β 防御素序列存在差异性,必定导致其重组蛋白抑菌效果的不同。而黄颡鱼是一种无鳞鱼类,从进化角度分析,其先天性免疫能力比有鳞鱼类强,推测其 β 防御素的抑菌效果要更好。因此,对黄颡鱼 β 防御素基因及其重组蛋白的抑菌效果进行深入的研究,并将 β 防御素应用于鱼类病害防治中十分必要。所以在此基础上,研发、筛选效果优良的抗菌肽药品取代抗生素已成为未来鱼类病害防控的必然发展趋势。

发明内容

[0006] 本发明的目的是一种黄颡鱼 β 防御素基因及其 β 防御素抗菌肽及其应用,本发明在克隆黄颡鱼 β 防御素基因核心区编码序列的基础上,利用基因工程技术进行重组表达制备而成的,实验表明其重组产物对革兰氏阳性菌中的金黄色葡萄球菌,以及革兰氏阴性菌中的大肠杆菌、嗜水气单胞菌、鮭爱德华氏菌、柱状黄杆菌都具有一定的生长抑制作用。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供一种黄颡鱼 β 防御素基因,所述黄颡鱼 β 防御素基因Pf_B D的ORF核苷酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0008] 本发明还提供了一种具有抑菌活性的 β 防御素抗菌肽,其氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。

[0009] 进一步地,所述 β 防御素抗菌肽的功能区含有6个相对保守的半胱氨酸残基。

[0010] 本发明还提供了一种重组表达载体PET-32a-Pf_B D,含有权利要求1所述Pf_B D的ORF片段成熟区的大肠杆菌表达载体。其中,所述大肠杆菌表达载体为PET-32a。

[0011] 含有上述重组表达载体PET-32a-Pf_B D的重组大肠杆菌BL21 (DE3) -PET-32a-Pf_B D。

[0012] 上述重组大肠杆菌BL21 (DE3) -PET-32a-Pf_B D的制备方法,包括以下步骤:

[0013] 1) 根据原核表达质粒PET-32a上的酶切位点的特征,以黄颡鱼 β 防御素基因Pf_B D的ORF片段成熟区核苷酸序列为模板,设计含有BamH I和EcoR I酶切位点的特异性引物Pf_B D-F2/R2:

[0014] Pf_B D-F2:CGCGGATCCGCTAAAGGAAATGCAATGGC

[0015] Pf_B D-R2:CCGGAATTCTCAGAGAATAACGTGAGACACAC

[0016] 2) 以前期获得的黄颡鱼Pf_B D的ORF片段cDNA为模板进行PCR,得到PCR产物;

[0017] 3) 用BamH I和EcoR I将PCR产物进行酶切,纯化回收;同时,用BamH I和EcoR I将大肠杆菌表达载体PET-32a进行双酶切,酶切产物跑琼脂糖凝胶电泳检测并回收大肠杆菌表达载体PET-32a大片段;

[0018] 4) 将回收的大肠杆菌表达载体PET-32a大片段和回收的PCR产物用T4连接酶4℃连接过夜,连接产物转化大肠杆菌感受态细胞BL21 (DE3),将筛选得到的阳性克隆用BamH I和

EcoR I进行酶切验证,获得得到重组大肠杆菌BL21 (DE3) -PET-32a-Pf_B D。

[0019] 作为优选方案,所述步骤2)中,PCR反应体系:

[0020] PCR反应体系

	试剂	使用量 (μL)
	cDNA 模板	2
	10×buffer	2
	dNTP	1.5
[0021]	Taq 酶	1
	<i>Pf</i> _BD-F2/R2	0.5/0.5
	MgCl ₂	2
	H ₂ O	10.5
	Total Volume	20

[0022] PCR反应条件:95℃预变性3min;95℃变性30s,58℃退火30s,72℃延伸30s,共35个循环;72℃延伸10min;16℃,5min。

[0023] 利用上述重组大肠杆菌BL21 (DE3) -PET-32a-Pf_B D提取具有抑菌活性的 β 防御素抗菌肽的方法,包括以下步骤:

[0024] 1) 将重组大肠杆菌BL21 (DE3) -PET-32a-Pf_B D加入到490mL含氨苄的LB液体培养基中,然后加入IPTG进行诱导培养,离心收集沉淀、震荡超声破碎离心得到上清液;

[0025] 2) 将所得上清经滤膜进行过滤,向滤液中加入终浓度为0.1mM的PMSF以备过柱,收集所有的穿透液和洗脱液,即为含有 β 防御素抗菌肽的溶液。

[0026] 作为优选方案,所述步骤2)中,滤液过柱的具体方法如下:

[0027] ①取准备好的Ni⁺-琼脂糖凝胶柱固定于铁架台上,首先打开上盖和下方开关,使其中的酒精保存液流出;

[0028] ②用15倍柱体积的平衡液(50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl,10mM imidazole,pH 8.0)平衡柱子,控制流速1mL/min;

[0029] ③将过滤后的上清液加入柱中,控制流速1mL/min;

[0030] ④用10倍柱体积的平衡液过柱,控制流速1mL/min,收集穿透液;

[0031] ⑤用4倍柱体积的洗脱液1(50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl,20mM imidazole,pH 8.0)过柱洗脱,控制流速1mL/min,分管收集洗脱液1;

[0032] ⑥用4倍柱体积的洗脱液2(50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl,50mM imidazole,pH 8.0)过柱洗脱,控制流速1mL/min,分管收集洗脱液2;

[0033] ⑦用4倍柱体积的洗脱液3(50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl,80mM imidazole,pH 8.0)过柱洗脱,控制流速1mL/min,分管收集洗脱液3;

[0034] ⑧用4倍柱体积的洗脱液4(50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl,100mM imidazole,pH 8.0)过柱洗脱,控制流速1mL/min,分管收集洗脱液4;

[0035] ⑨用4倍柱体积的洗脱液5(50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl,200mM imidazole,pH 8.0)过柱洗脱,控制流速1mL/min,分管收集洗脱液5;

[0036] ⑩用4倍柱体积的洗脱液6(50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl,250mM imidazole,pH 8.0)过柱洗脱,控制流速1mL/min,分管收集洗脱液6;

[0037] ⑪用4倍柱体积的洗脱液7 (50mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 500mM imidazole, pH 8.0) 过柱洗脱, 控制流速1mL/min, 分管收集洗脱液7;

[0038] ⑫用10倍柱体积的平衡液过柱, 控制流速1mL/min;

[0039] ⑬用10倍柱体积的30%酒精过柱, 后加10倍柱体积的30%酒精保存预装柱。

[0040] 上述 β 防御素抗菌肽用于抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、嗜水气单胞菌、鮠爱德华氏菌、柱状黄杆菌的生长的药品中应用。

[0041] 上述 β 防御素抗菌肽作为广谱抗菌药物在水产养殖中的应用。

[0042] 本发明的有益效果在于:

[0043] 本发明通过基因克隆、原核表达、特有的蛋白纯化技术以及操作简单的体外抑菌活性鉴定方法, 展示了黄颡鱼 β 防御素抗菌肽具有良好的体外广谱抑菌活性作用, 这不仅有助于揭示 β 防御素抗菌肽在鱼类固有免疫中的作用途径和机制, 而且对后期的广谱抗菌药物开发和免疫增强剂的筛选奠定了有力的技术基础。

附图说明

[0044] 图1为黄颡鱼 β 防御素基因开放阅读框 (ORF) 克隆序列图,

[0045] 图中, 划线处为信号肽区, 阴影部分为成熟肽区;

[0046] 图2为PCR扩增黄颡鱼 β 防御素基因成熟肽 (ORF去除信号肽部分) 片段电泳图;

[0047] 图3为黄颡鱼 β 防御素重组蛋白抑菌效果图;

[0048] 图中, 图3A为大肠杆菌抑菌图, 图3B为嗜水气单胞菌抑菌图, 图3C为金黄色葡萄球菌抑菌图, 图3D为鮠爱德华氏菌抑菌图, 图3E为柱状黄杆菌抑菌图;

[0049] 图4为不同浓度黄颡鱼 β 防御素重组蛋白对5种细菌的抑菌效果折线图。

具体实施方式

[0050] 为了更好地解释本发明, 以下结合具体实施例进一步阐明本发明的主要内容, 但本发明的内容不仅仅局限于以下实施例。

[0051] 实施例1黄颡鱼 β 防御素基因开放阅读框 (ORF) 片段的克隆。

[0052] 1. 黄颡鱼 β 防御素基因开放阅读框 (ORF) 片段的克隆

[0053] 根据本实验室已有的部分黄颡鱼转录组数据, 检索获得黄颡鱼 β 防御素基因的预测序列, 用Primer 5.0设计用于扩增 β 防御素的ORF区域的引物Pf_B D-F1/R1:

[0054] Pf_B D-F1: ATGAAGTATCAAGGGATGACCAT

[0055] Pf_B D-R1: TCAGAGAATAACGTGAGACACAC

[0056] PCR反应体系如下表1-1:

[0057] 表1-1 PCR反应体系

	试剂	使用量 (μL)
	cDNA 模板	2
	10 \times buffer	2
	dNTP	1.5
[0058]	Taq 酶	1
	<i>Pf</i> _BD-F1/R1	0.5/0.5
	MgCl ₂	2
	H ₂ O	10.5
	Total Volume	20

[0059] PCR反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火30s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30s,共35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10min;16 $^{\circ}\text{C}$,5min。反应结束后,20 μL PCR产物加入4 μL 6 \times loading buffer混合均匀,用1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,150V,30min。

[0060] 2. PCR产物的回收

[0061] 此过程按照Axygen公司的凝胶回收试剂盒进行操作,具体如下:

[0062] (1)通过凝胶成像系统,将所获得的含有目的片段的凝胶切下至2mL离心管中并称重,默认为100mg=100 μL 。

[0063] (2)加入3倍凝胶体积的Buffer DE-A,65 $^{\circ}\text{C}$ 加热,每2min摇匀一下,直至无明显胶状物出现,整个过程大概10min。

[0064] (3)加入0.5倍Buffer DE-A体积的Buffer DE-B,混合均匀,当目的片段小于400bp时,需加入一个体积的异丙醇。

[0065] (4)将步骤(3)中的混合液转移至DNA制备管中,12000g离心1min,弃滤液。

[0066] (5)将制备管置入2mL离心管中,加入500 μL Buffer W1,12000g离心1min,弃滤液。

[0067] (6)将制备管置入2mL离心管中,加入700 μL Buffer W2,12000g离心1min,弃滤液。

[0068] (7)重复上述步骤(6)一次。

[0069] (8)将制备管置入2mL离心管中,12000g离心1min。

[0070] (9)将制备管置于1.5mL离心管中,加入20 μL 60 $^{\circ}\text{C}$ 加热过的Eluent water,室温静置1min,12000g离心1min,所得DNA保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

[0071] 3. 连接与转化

[0072] 此步骤按照连接试剂盒(TAKARA)公司说明书进行操作,连接反应体系如下表1-2:

[0073] 表1-2连接反应体系

	试剂	使用量 (μL)
	PMD-18T 载体	0.5
[0074]	DNA	4.5
	Solution I	5
	Total Volume	10

[0075] 反应条件:16 $^{\circ}\text{C}$ 连接2-3h,片段过长需过夜连接。

[0076] 转化步骤:

[0077] (1)将10 μL 连接产物加入到100 μL 大肠杆菌DH5 α 感受态细胞液中,冰上放置30min(此时打开水浴锅42 $^{\circ}\text{C}$,注意水位)。

- [0078] (2) 然后放到42℃水浴锅中热激90s, 再在冰上放置3min。
- [0079] (3) 加入890μL LB液体培养基, 37℃震荡培养60min。
- [0080] (4) 在每个固体培养平板上分别加入40μL X-gal和4μL IPTG, 然后吸取100μL菌液, 均匀涂布在含有Amp的LB固体培养基平板上。
- [0081] (5) 将平板37℃培养箱正放30min, 待表面菌液被吸干后, 倒置平板, 培养最多16h。
- [0082] 4. 目的片段的菌落PCR及测序
- [0083] 菌落PCR及测序的步骤如下:
- [0084] (1) 在平板上挑取10-20个白色菌落, 分别加入到1mL含有千分之一Amp的LB液体培养基中。
- [0085] (2) 37℃震荡培养4h。
- [0086] (3) 3000r/min离心3min, 吸掉上层400μL上清液。
- [0087] (4) 短暂涡旋将沉淀打散, 然后将菌液当成模板进行PCR扩增。
- [0088] (5) 电泳检测, 选择目的条带亮度大且无二聚体的菌液送公司测序。
- [0089] 实施例2黄颡鱼β防御素基因核心编码区(ORF去除信号肽部分)的克隆及原核重组表达质粒的构建。
- [0090] 根据原核表达质粒PET-32a上的酶切位点的特征, 专门设计一对分别添加了BamH I和EcoR I酶切位点的特异性引物Pf_B D-F2/R2:
- [0091] Pf_B D-F2:CGCGGATCCGCTAAAGGAAATGCAATGGC
- [0092] Pf_B D-R2:CCGGAATTCTCAGAGAATAACGTGAGACACAC
- [0093] 引物序列的划线处分别为BamH I和EcoR I酶切位点, 酶切位点5'端的粗体部分(CGC和CCG)为保护性碱基。使用PCR扩增技术, 以实验一中克隆得到的ORF片段为cDNA模板, 反应程序为(首先, 95℃预变性5分钟; 接着, 95℃变性30秒, 62℃退火30秒, 72℃延伸30秒, 共35个循环; 最后, 72℃延伸10分钟); 将克隆得到的目的条带切胶回收后与PMD-18T载体连接2.5小时; 后将连接产物转化至大肠杆菌DH5α; 涂平板筛选单克隆进行测序, 将测序结果正确的菌液隔夜培养, 次日根据质粒提取试剂盒提取质粒; 将所提取质粒用BamH I和EcoR I限制性内切酶做双酶切, 将双酶切回收后的目的片段再与经BamH I和EcoR I双酶切的PET-32a大片段进行连接, 从而完成黄颡鱼β防御素基因原核重组表达载体PET-32a-Pf_B D的构建(PCR产物的回收, 连接与转化, 目的片段的菌落PCR等具体步骤参考上述实施例1)。
- [0094] 实施例3: 原核重组表达载体在大肠杆菌中诱导与表达。
- [0095] 将构建好的重组表达载体PET-32a-Pf_B D导入到大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中, 涂平板挑阳性克隆接种于10mL含氨苄的LB液体培养基中, 37℃, 200rpm过夜培养, 加等体积30%甘油-35℃保存备用。
- [0096] 最佳诱导表达条件的摸索:
- [0097] (1) 不同时间诱导表达: 取1mL备用菌加入到9mL LB液体培养基中, 培养到OD₆₀₀为0.6~0.8, 然后取1mL菌液分装到2mL制备管中, 共7管, 同时取相同条件下的PET-32a空质粒菌液1mL做对照, 8管菌液都加入终浓度为1mM的IPTG, 37℃, 200rpm培养。空质粒菌液诱导4小时, 重组表达质粒的菌液每隔1h取一管1mL进行SDS-PAGE上样前样品预处理, 分别为1~7h诱导表达。(样品处理方法: 4℃, 6000rpm离心, 保留菌体沉淀, 加入100μL PBS缓冲液涡旋震荡, 后取20μL加入等体积的2×SDS蛋白上样缓冲液, 100℃水浴加热15min, 空载质粒菌液

处理同上,后进行SDS-PAGE上样检测表达结果。)

[0098] (2) 不同IPTG浓度诱导表达:取0.2mL备用菌加入到9.8mLLB液体培养基中,培养到 OD_{600} 为0.6~0.8,然后取1mL菌液分装到2mL制备管中,共8管,然后依次加入终浓度分别为0mM,0.1mM,0.2mM,0.5mM,0.8mM,1.0mM,1.2mM,1.5mM的IPTG,37℃,200rpm培养4h。然后进行上样前的样品预处理,方法同(1),最后进行SDS-PAGE上样检测表达结果。

[0099] (3) 重组蛋白的可溶性检测:取2mL备用菌加入到98mL LB液体培养基中,培养到 OD_{600} 为0.6~0.8,加入终浓度为0.2mM的IPTG进行诱导培养6h,后4℃,6000rpm离心10min收集沉淀,加入10mL PBS缓冲液涡旋震荡,加入终浓度为0.1mM的PMSF后进行超声波细菌破碎30min,将破碎后的液体4℃,12000rpm离心15min,后分别取上清50μL,沉淀少许加入50μL PBS缓冲液,后各加入等体积2×SDS上样缓冲液,100℃水浴加热15分钟,最后进行SDS-PAGE上样检测表达结果。

[0100] 最终确定最佳诱导时间为6h,最佳诱导的IPTG浓度为0.2mM,重组蛋白主要以可溶性形式存在于上清中。

[0101] 实施例4:重组蛋白的分离与纯化。

[0102] (1) 重组蛋白的分离:取10mL备用菌加入到490mL含氨苄的LB液体培养基中,37℃,200rpm培养至 OD_{600} 为0.6~0.8,加终浓度为0.2mM的IPTG继续培养6h,后4℃,6000rpm离心10min收集沉淀,加入30mL PBS缓冲液涡旋震荡,加入终浓度为0.1mM的PMSF后进行超声波细菌破碎30min,将破碎后的液体4℃,12000rpm离心15min,保留上清去除沉淀,以备纯化。

[0103] (2) 重组蛋白的纯化:本实验蛋白纯化方法是根据上海生工生物有限公司的 Ni^{2+} -琼脂糖凝胶柱对带有His标签的蛋白进行纯化,具体方法如下:将所得上清经0.22μm的滤膜进行过滤,向滤液中加入终浓度为0.1mM的PMSF以备过柱。纯化采取不同浓度的咪唑洗脱液分阶段洗脱的方式以便达到最佳纯化效果。步骤如下:

[0104] ①取准备好的 Ni^{2+} -琼脂糖凝胶柱固定于铁架台上,首先打开上盖和下方开关,使其中的酒精保存液流出;

[0105] ②用15倍柱体积的平衡液(50mM NaH_2PO_4 ,300mM NaCl,10mM imidazole,pH 8.0)平衡柱子,控制流速1mL/min;

[0106] ③将过滤后的上清液加入柱中,控制流速1mL/min;

[0107] ④用10倍柱体积的平衡液过柱,控制流速1mL/min,收集穿透液;

[0108] ⑤用4倍柱体积的洗脱液1(50mM NaH_2PO_4 ,300mM NaCl,20mM imidazole,pH 8.0)过柱洗脱,控制流速1mL/min,分管收集洗脱液1;

[0109] ⑥用4倍柱体积的洗脱液2(50mM NaH_2PO_4 ,300mM NaCl,50mM imidazole,pH 8.0)过柱洗脱,控制流速1mL/min,分管收集洗脱液2;

[0110] ⑦用4倍柱体积的洗脱液3(50mM NaH_2PO_4 ,300mM NaCl,80mM imidazole,pH 8.0)过柱洗脱,控制流速1mL/min,分管收集洗脱液3;

[0111] ⑧用4倍柱体积的洗脱液4(50mM NaH_2PO_4 ,300mM NaCl,100mM imidazole,pH 8.0)过柱洗脱,控制流速1mL/min,分管收集洗脱液4;

[0112] ⑨用4倍柱体积的洗脱液5(50mM NaH_2PO_4 ,300mM NaCl,200mM imidazole,pH 8.0)过柱洗脱,控制流速1mL/min,分管收集洗脱液5;

[0113] ⑩用4倍柱体积的洗脱液6(50mM NaH_2PO_4 ,300mM NaCl,250mM imidazole,pH 8.0)

过柱洗脱,控制流速1mL/min,分管收集洗脱液6;

[0114] ⑪用4倍柱体积的洗脱液7 (50mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 500mM imidazole, pH 8.0) 过柱洗脱,控制流速1mL/min,分管收集洗脱液7;

[0115] ⑫用10倍柱体积的平衡液过柱,控制流速1mL/min;

[0116] ⑬用10倍柱体积的30%酒精过柱,后加10倍柱体积的30%酒精保存预装柱。

[0117] 将所收集的穿透液及所有洗脱液均取20 μL ,进行上样前的预处理,以便进行SDS-PAGE检测。

[0118] 最终成功分离出目的蛋白,过柱后的洗脱液1~7中的目的蛋白浓度最高为4500 $\mu\text{g}/\text{mL}$,最低为300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0119] 实施例5:重组蛋白体外抑菌活性的鉴定。

[0120] (1) 实验菌体的培养与制备

[0121] 将各种实验菌过夜培养活化,金黄色葡萄球菌、大肠杆菌37 $^{\circ}\text{C}$, 200rpm培养,嗜水气单胞菌、鲎爱德华氏菌、柱状黄杆菌28 $^{\circ}\text{C}$, 200rpm培养,次日按1:50稀释继续培养至 OD_{600} 为0.6。

[0122] (2) 重组蛋白抑菌活性检测

[0123] 将纯化得到的蛋白分别稀释至4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 备用。取直径150mm的不加氨苄的LB固体培养基,将400 μL 上述各实验菌分别涂平板,在平板上均匀加入灭菌的牛津杯,在其中分别加入4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度梯度的重组蛋白100 μL ,同时设置加等体积的灭菌双蒸水和0.1M的Amp作为对照组,金黄色葡萄球菌、大肠杆菌37 $^{\circ}\text{C}$ 培养,嗜水气单胞菌、鲎爱德华氏菌、柱状黄杆菌28 $^{\circ}\text{C}$ 培养,12h后观察、测定抑菌圈直径大小并记录。

[0124] 通过观察、测定抑菌圈直径大小(表2),得出结论,本实验分离出的 β 防御素重组蛋白对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、嗜水气单胞菌、鲎爱德华氏菌、柱状黄杆菌的生长均具有一定的抑制作用,对各个实验菌的抑制作用根据重组蛋白浓度的变化而表现出不同的差异性。对金黄色葡萄球菌而言,当蛋白浓度达到500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,重组蛋白的抑菌效果才开始显现,当蛋白浓度达到2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,抑菌效果达到最高峰。对大肠杆菌而言,当蛋白浓度达到250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,随着蛋白浓度的升高,抑菌作用也逐渐加强。对嗜水气单胞菌而言,最小抑菌蛋白浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,且抑菌效果在蛋白浓度达到1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时达到最高峰。对鲎爱德华氏菌而言,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 是其最小的抑菌蛋白浓度,1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时达到最高峰,随后,随着蛋白浓度的升高,抑菌作用有下降的趋势。对柱状黄杆菌而言,1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蛋白浓度才对其生长起到抑制作用,蛋白浓度为2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时抑制作用最为明显。

[0125] 表2不同浓度重组蛋白对各实验菌的抑菌效果(抑菌圈直径大小)

重组蛋白浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	抑菌圈直径(mm)				
	大肠杆菌	嗜水气单胞菌	鲷爱德华氏菌	柱状黄杆菌	金黄色葡萄球菌
0	0, 0, 0	0, 0, 0	0, 0, 0	0, 0, 0	0, 0, 0
50	0, 0, 0	0, 0, 0	0, 0, 0	0, 0, 0	0, 0, 0
100	0, 0, 0	7, 8, 9	0, 0, 0	0, 0, 0	0, 0, 0
250	8, 8, 9	9, 9, 9	0, 0, 0	0, 0, 0	0, 0, 0
500	9, 10, 10	11, 11, 12	10, 10, 11	0, 0, 0	11, 12, 13
1000	15, 16, 17	16, 16, 17	15, 16, 17	9, 9, 10	13, 14, 14
2000	17, 18, 19	13, 13, 14	14, 14, 14	12, 12, 12	18, 18, 18
4000	20, 21, 22	14, 14, 14	12, 13, 13	7, 8, 8	15, 16, 16
Amp+	22, 24, 26	17, 19, 19	13, 14, 15	66, 60, 59	26, 25, 26

[0127] 注：每种细菌在每个浓度重组蛋白作用下的3个数据表示3次重复实验。

[0128] 其它未详细说明的部分均为现有技术。尽管上述实施例对本发明做出了详尽的描述，但它仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部实施例，人们还可以根据本实施例在不经创造性前提下获得其他实施例，这些实施例都属于本发明保护范围。

- [0001] <110> 华中农业大学
- [0002] <120> 黄颡鱼 β 防御素基因及其 β 防御素抗菌肽及其应用
- [0003] <211>225bp
- [0004] <212> DNA
- [0005] <213> 黄颡鱼 β 防御素基因
- [0006] ATGAAGTATCAAGGGATGACCATGAACCATCAAAGAATGCTATTCCTGTGGTTTTTTATCATGTTGGCA
ATTGCTGCTAAAGGAAATGCAATGGCAGCATTTCCCTGGAGTTGTACAAACTACAGTGGTGTGTGCCGTCCAATATG
CCTGCCTACAGAACTACCCTTTGGACCTTTTGCTTGCTCTAAAGGGTTTGTGGCTGTGTGTCTCACGTTATTCTCT
GA
- [0007] <210>2
- [0008] <211> 49aa
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> β 防御素抗菌肽
- [0011] <400> 2
- [0012] AKGNAMAAFPWSCTNYSGVCRPICLPTELPGPFACSKGFVCCVSHVIL

```

1 ATGAAGTATCAAGGGATGACCATGAACCATCAAAGAATGCTATTCCTGTGGTTTTTTATC
1  M K Y Q G M T M N H Q R M L F L W F F I
61 ATGTTGGCAATTGCTGCTAAAGGAAATGCAATGGCAGCATTTCCTGGAGTTGTACAAAC
21  M L A I A A K G N A M A A F P W S C1 T N
121 TACAGTGGTGTGTGCCGTCCAATATGCCTGCCTACAGAACTACCCTTTGGACCTTTTGCT
41  Y S G V C2 R P I C3 L P T E L P F G P F A
181 TGCTCTAAAGGGTTTGTGTTGCTGTGTGTCTCACGTTATTCTCTGASGAATCATTACGTTA
61  C4 S K G F V C5 C6 V S H V I L *
    
```

图1

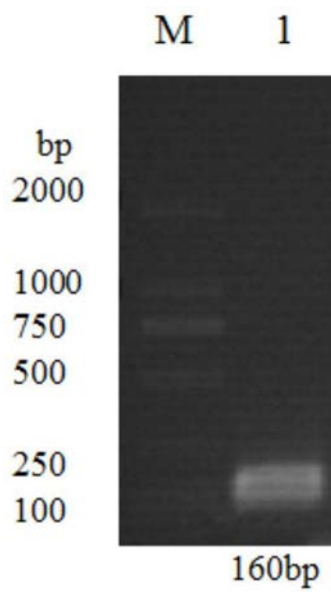


图2

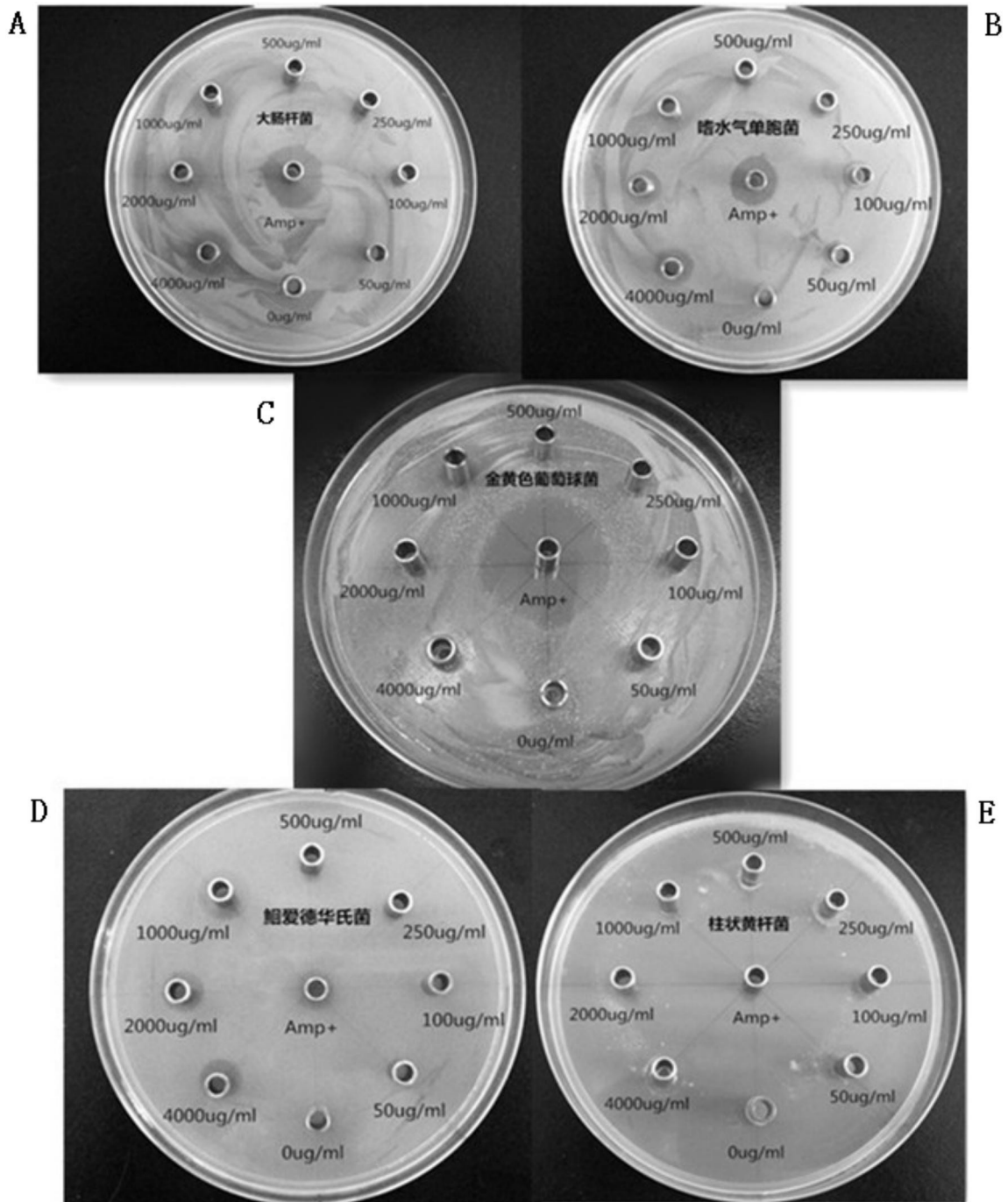


图3

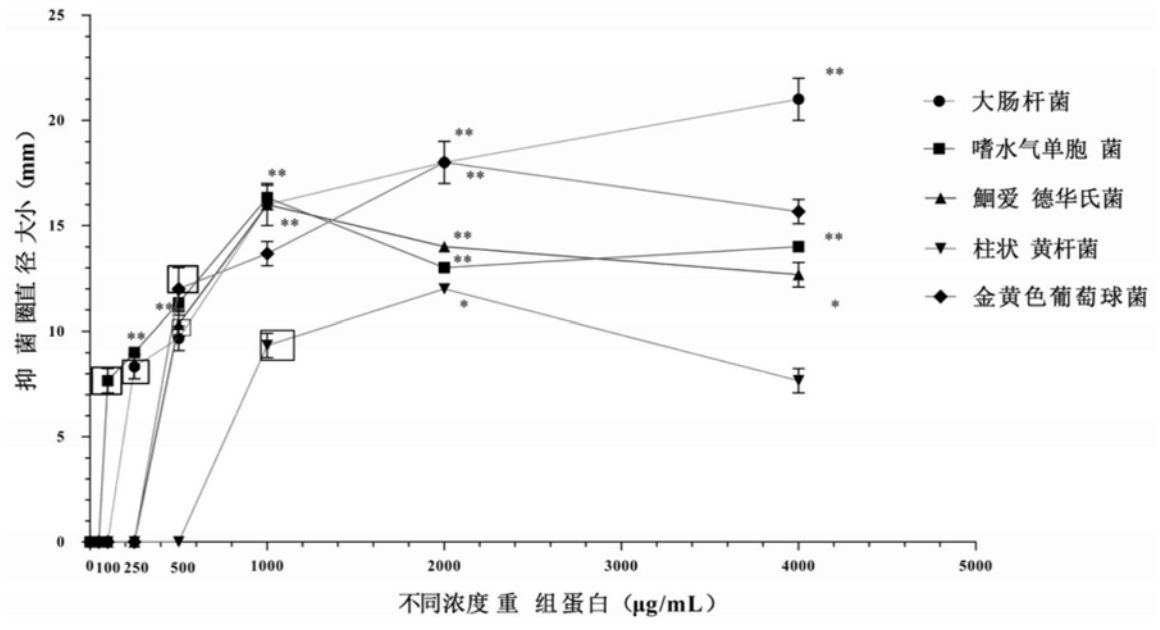


图4