

东亚正钳蝎毒素基因 BmKbpp 的原核表达及其抗菌功能初步鉴定

罗 锋, 李 正, 范丽梅, 梁 勇, 林 燕, 蒋 琳

(江汉大学 医学院, 湖北 武汉 430056)

摘 要: 一级结构分析和二级结构预测表明无二硫键蝎毒液多肽 (NDBPs) BmKBPP 具两亲性 α -Helix 结构, 含有大量带净正电荷的碱性残基 (Arg 和 Lys), 符合多价阳离子抗菌肽的典型特征。采用 PCR 法和质粒载体 pGEX-5X-1 构建 BmKbpp、EGFP 及 BmKbpp/EGFP 与 GST 的原核融合表达载体, 3 个表达载体与 pGEX-5X-1 分别在 Rossetta (DE3) 菌中进行表达, 并测定 4 个 Rossetta (DE3) 表达工程菌诱导表达的生长曲线。结果表明, BmKBPP 是一个具有很强抑菌功能的抗菌肽, GST、BmKBPP 及 EGFP 3 个蛋白一起融合表达可获得少量蛋白的表达, 这将为后续的功能研究和应用研究奠定基础。

关键词: 蝎毒素; 抗菌肽; BmKbpp; 原核表达

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-0143(2012)05-0064-07

20 世纪初抗生素的发现堪称医药技术发展史上重大里程碑之一, 但日趋严重的耐药细菌感染已成为国际医学界面临的一个棘手难题^[1-3]。“超级病菌”耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 感染在美国每年致死人数超过艾滋病^[4], 临床研究表明对 MRSA 有效的仅有万古霉素, 而作为对付细菌感染最后一道防线的万古霉素副作用严重, 且临床上也已出现耐万古霉素细菌^[5]。在我国由于滥用抗生素, 耐药菌所致院内感染人数已居住院感染患者总人数的 30% 左右^[3]。人们长期以来广泛而不加选择地使用抗生素^[6], 结果导致一系列耐药微生物出现, 给细菌性疾病的控制和治理带来极大困难, 因此发现和研制新一代抗菌药物的任务日趋紧迫^[7]。

阳离子宿主防御肽 (也称为抗菌肽或肽类抗生素) 在大多数生物的天然防御方面具有重要的功能^[8-10], 用于抵御 G⁺菌、G⁻菌、真菌、原虫及病毒感染, 据报道其中一些阳离子多肽能抑制 MRSA 的生长^[3,11-12]。目前鉴定到的抗菌肽数量已超过 1 300 种^[3], 这类多肽通常分子量都相对

较小(2~5 ku), 长度为 10~50 氨基酸残基, 具有 2~9 个净正电荷, 相互之间同源性较低。根据抗菌肽的二级结构可将其分为 4 种^[1]: (a) 线性 α -螺旋肽, 如人的 LL-37; (b) β -折叠型多肽, 如植物防御素 hepcidin; (c) 环肽 (含一对二硫键); (d) 富含某种氨基酸的线性肽, 如牛的 indolicidin。其中前 2 种类型是自然界中最常见的抗菌肽类型。研究表明阳离子抗菌肽可选择性作用于细胞外膜或信号通路中不同的靶标^[1,13], 与传统抗生素相比较, 这可能是细菌对阳离子抗菌肽更难产生抗性的原因。另有一些研究表明抗菌肽不仅具有抗菌活性, 而且还作为信号分子参与免疫反应调节 (尤其是感染和炎症)^[1,14]。阳离子抗菌肽具有分子量小、广谱抗菌活性及不易产生耐药性等特点, 因此作为潜在的理想治疗因子已广泛得到学者们的关注^[1,12,15]。

近年来, 一些阳离子抗菌肽也从蝎淋巴液及毒腺中先后得到了分离和鉴定, 包括 hadrurin, scorpine, opistoporins, parabutoporin^[16], BmKn2 和 BmKb1^[17], mucroporin^[3], imcroporin^[11], 及 StCT1^[2]

收稿日期: 2012-05-21

基金项目: 武汉市科技局青年科技晨光计划项目 (200950199019-03); 武汉市市属高等学校科学研究重点项目 (20070705); 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队项目 (T2012)

作者简介: 罗 锋 (1975—), 男, 讲师, 博士, 研究方向: 毒素分子生物学。

等。这是一类长度为 13~50 个氨基酸的无二硫键蝎毒液多肽 (Non-Disulfide-Bridged Peptides, NDBPs), 具有抗菌及免疫调节等功能^[18]。BmKbpp 基因是从马氏正钳蝎 cDNA 文库中分离到的第一个 NDBP 基因^[19], 其 cDNA 序列编码一个 47 氨基酸的成熟肽, 生理学功能尚未得到鉴定。分析表明 BmKBPP 多肽与抗菌肽 paratopporin 具有较高的同源性^[16]。二级结构预测 BmKBPP 多肽具有典型两亲性 α -Helix 结构, 含有大量带净正电荷的碱性残基 (Arg 和 Lys), 符合多价阳离子抗菌肽的典型特征。本研究通过对 BmKbpp 基因进行克隆表达, 测定各克隆子诱导表达生长曲线, 初步证实其具有很强抑菌功能, 为后续进一步的功能研究奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

表达载体 pGEX-5X-1 及用于克隆和表达的原核宿主菌 (*E. coli*) DH5 α 、Rossetta (DE3) 菌株均为江汉大学医学院保存; 限制性内切酶、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、PCR 所用试剂和酶均为 Takara 公司产品; T4 连接酶购自 Promega 公司; PCR 产物纯化试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Omega 公司; 引物合成服务由上海生工提供; β -ME (β -巯基乙醇) 购自 Sigma 公司; 其他化学试剂均为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 引物设计和合成 根据 BmKbpp cDNA 序列 (简称为 BPP)^[19] 及 pEGFP-N1 载体中增强型绿色荧光蛋白基因 (EGFP) 序列, 设计引物 (FP: 正向引物, RP: 反向引物) 如下: (1) BPP-FP: 5'-GCCGGATCCCCGATGACGATGACAAGTTCAGATTGGGAAGC-3' (对应 BmKBPP 成熟肽编码区 1~15 位核苷酸, 含 BamHI 酶切位点和小肠激酶酶切位点核酸序列); (2) BPP-RP1: 5'-GCCCTCGAGTCAATTCGGCTGGAGCCGCAGC-3' (对应 BmKBPP 成熟肽编码区 124~141 位核苷酸, 含 XhoI 酶切位点和终止密码子); (3) BPP-RP2: 5'-ATCTTCTGAATTCGGCTGGAG-3' (对应包含 BmKBPP 成熟肽编码区的 131~151 位核苷酸, 142~144 位 CTA 突变成 TTC, 含 EcoRI 酶切位

点); (4) EGFP-FP1: 5'-GCGGATCCCCATGCTGAGCAAGGGCGA GGAG-3' (对应 EGFP 编码序列 5' 区, 含 BamHI 酶切位点和起始密码子); (5) EGFP-FP2: 5'-GCGAATTCATGCTGAGCAA-GGGCGAGG-3' (对应 EGFP 编码序列 5' 区, 含 EcoRI 酶切位点、起始密码子); (6) EGFP-RP: 5'-GCCTCGAGTCACTTGTACAGCTCGTCCATG-3' (对应 EGFP 编码序列 3' 区, 含 XhoI 酶切位点和终止密码子)。

1.2.2 重组表达载体构建 目的片段制备: 以 BmKbpp cDNA 克隆子或 EGFP 基因为模板, 采用引物对 BPP-FP/BPP-RP1、EGFP-FP1/EGFP-RP、BPP-FP/BPP-RP2+EGFP-FP2/EGFP-RP 分别扩增重组载体 pGEX-5X-1/BmKbpp、pGEX-5X-1/EGFP、pGEX-5X-1/BmKbpp/EGFP 所对应目的基因 (PCR 反应: 94 $^{\circ}$ C 预变性 300 s, 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 54 $^{\circ}$ C 复性 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 进行 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 300 s); 酚-氯仿抽提法纯化 PCR 产物。

重组质粒构建及筛选鉴定: 使用对应限制酶对 PCR 回收产物和载体质粒进行双酶切; 酶切产物经 EZNA 胶回收试剂盒回收纯化; 将 PCR 产物与表达载体进行连接 (1 U/ μ L T4 DNA 连接酶 0.5 μ L, PCR 产物与载体物质的量比 3:1, DNA 总量 50 ng, 5 \times 连接反应缓冲液 2 μ L, 加无菌水至总体积 10 μ L, 置 14 $^{\circ}$ C 连接 24 h); 连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞; PCR 法和限制性酶切反应筛选阳性重组子; pGEX-3' 通用引物测序。

1.2.3 GST-融合蛋白的原核表达 将重组质粒转化 Rossetta (DE3) 感受态细胞, LB 抗性平板筛选转化子, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h; 接种后过夜培养; 将过夜培养菌液以 1:100 比例接种, 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 约 0.6 时, 加入 IPTG (终浓度 0.4 mM), 28 $^{\circ}$ C 条件下诱导表达 3~5 h; 室温 5 000 g 离心 10 min 收集细胞, 弃上清; 沉淀重悬于 10~20 mL (1/20~1/50 体积) 冰浴预冷的 PBS (可选择加溶菌酶至终浓度 500 μ g/mL, 冰上置 45 min); 超声波破碎细胞, 至培养物变成不黏稠半透明状 (80 Hz, 30 s/次); 破碎的细胞液于 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min, 除去不溶成分和未裂

解细胞,取上清,通过 SDS-PAGE 检测表达情况。

1.2.4 抑菌生长曲线的测定 将质粒 pGEX-5X-1 及重组质粒 pGEX-5X-1/BmKbpp、pGEX-5X-1/EGFP 和 pGEX-5X-1/BmKbpp/EGFP 分别转化 Rossetta(DE3)菌,获表达工程菌;控制 4 个工作菌株起始 OD₆₀₀ 值在 0.6~0.8 之间(尽量使之一致),进行诱导表达;然后分别在 0、15、45、75、135、195、315、435 min 时取样;测定菌液 OD₆₀₀ 值(稀释保证所测样品 OD₆₀₀ 值均在 0.3~0.6 范围内,每个样测定前尽量摇匀并至少重复测定 3 次,求取平均值),记录所得数据;使用软件 Origin 6.0 分析制作生长曲线图(生长曲线测定实验重复 3 次以上)。

1.2.5 序列分析、系统发生树构建、蛋白质等电点与二级结构预测 使用软件 Primer Premier 5.0 进行引物设计与优化;多序列比较、序列分析及系统发生树绘图使用软件 DNAMAN、GENEDOC、GENERUNR、CLUSTAL X 1.83 及 TreeView 1.6;生长曲线作图采用软件 Origin 6.0;软件

AHTHEPROT 2000 V5.2 用于蛋白质的等电点计算、使用 NPS@ server 进行二级结构在线预测及作图(<http://antheprot-pbil.ibcp.fr/>)。

2 结果与分析

2.1 结构特征与分析表明:BmKBPP 是一个抗菌肽分子

BmKbpp 基因所编码前体肽一级序列分析: BmKbpp 是在江汉大学医学院构建的高质量 cDNA 文库中鉴定到的一个 NDBPs^[19],其 cDNA 序列编码一个 72 氨基酸残基的前体肽,包括 22 氨基酸的信号肽、47 氨基酸的成熟肽和 3 个额外的 Arg(可能在后续加工过程被切除)。BmKBPP 多肽与抗菌肽 parabutopirin^[16] 同源性最高,为 61.7%,其相似性更是高达 89.4%(图 1A, 1B)。BmKBPP 与来源于蝎的抗菌肽分子 opistopirin 1 和 2、pandinin 2 及 hadrurin 也均有一定的同源性(图 1A, 1B),这一类肽长度为 40~50 氨基酸,并具有一个典型的保守序列: S(x)3KxWxS(x)5L(图 1A)^[16]。

A. Alignment of 6 NDBPs from scorpion

opistopirin1	GKVVWKIKS	TARRLQMS	EPVKE	LRNTALNAA	KNLVAERKIGATPS	44
opistopirin2	GKVVWKIKS	TARRLQMS	EPVKE	LRNTALNAA	KNFVAERKIGATPS	44
pandinin	GKVVWKIKS	AARRLQMS	EPVQS	LRKQVNLNAA	KNYVAERKIGATPT	44
hadrurin	GILKTIKSL	ASRQMS	KTVQR	LRKGINWV	ANKLGVSPQAA	41
parabutopirin	FKLGSFL	RRVRS	KLAKR	LRKGRKML	KDYARGLLECGEE	EVPGQ
bmbpp	FRFGSFL	RRVRS	KLAKR	LRKGRQLL	KDYANKVLNGPPE	EAAAPAE
Consensus		s	k	w	s	l

B. Homology tree of 6 NDBPs

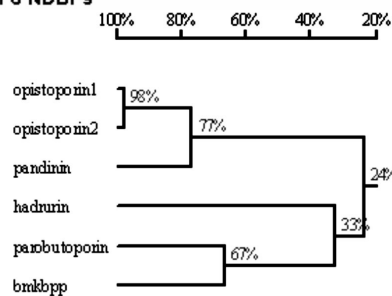


图 1 BmKbpp 基因编码所成熟肽与其他蝎抗菌肽的同源性比较

采用在线软件 NPS@ server (DSC 法, Discrimination of Protein Secondary Structure Class) 预测 BmKBPP 多肽序列二级结构,并以软件 AHTHEPROT 2 000 显示其二级结构图像。结果表明, BmKBPP 含 91.49% 的 α -Helix 结构(图 2A), 10~27 区为一核心螺旋区域,具典型的两亲性 α -Helix 结构,含大量带净正电荷碱性残

基(Arg 和 Lys)(图 2B)。BmKBPP 等电点(pHi)计算结果为 10.585(图 2C)。这与来源其他蝎种的两个抗菌肽分子 parabutopirin 和 opistopirin 1 非常相似, parabutopirin 和 opistopirins 能有效抑制 G-菌和真菌生长^[16]。因此,一级结构分析和二级结构预测结果均表明 BmKBPP 是一个抗菌肽分子。

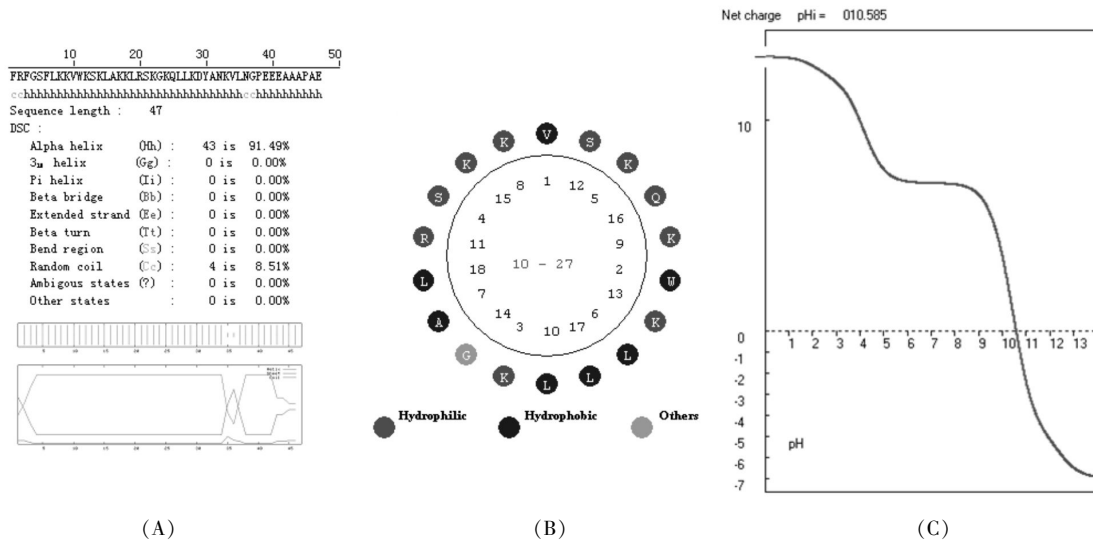
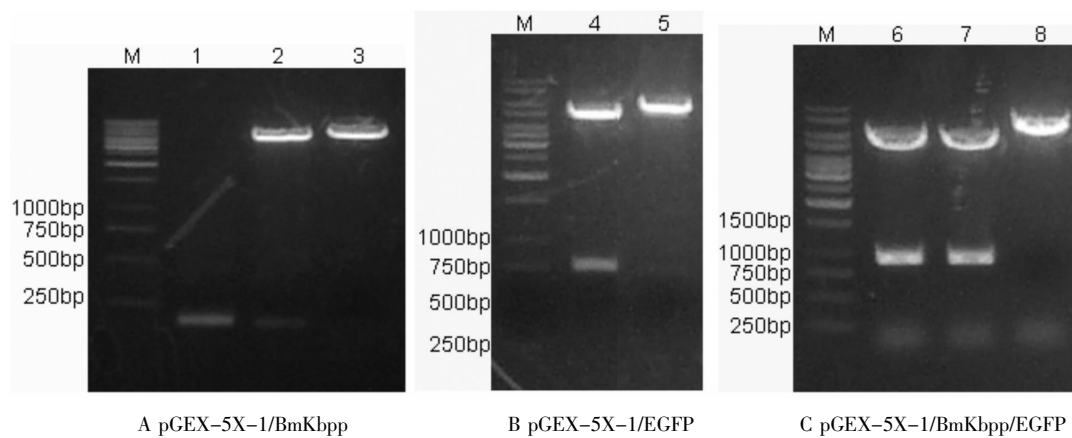


图 2 BmKBPP 多肽结构特征与分析

2.2 重组原核表达载体的构建

以 BmKbpp 全长 cDNA 克隆子或 EGFP 基因为模板, 采用引物对 (1) BPP-FP1/BPP-RP1、(2) BPP-FP1/BPP-RP2、(3) EGFP-FP2/EGFP-RP 和 (4) EGFP-FP1/EGFP-RP 进行 PCR 扩增。分别用对应的限制性内切酶对 4 个 PCR 回收产物及 pGEX-5X-1 质粒载体进行双酶切并回收纯化, PCR 产物(1)和(4)分别与 pGEX-5X-1 连接, 而(2)和(3)则与 pGEX-5X-1 3 种 DNA 分子一起连接, 3 种连接产物分别转化 DH5α 细胞。3 种转化子(pGEX-5X-1 与 PCR 产物(1)、(4)、

(2)+(3), 分别命名为 1、2、3 号转化子) 经抗性和 PCR 方法筛选阳性克隆子, 提取质粒后酶切鉴定结果表明: 1 号转化子阳性克隆子分别含有约 200 bp 大小目的插入片段(BmKbpp)(图 3A); 2 号转化子阳性克隆子具有近 750 bp 目的插入片段(EGFP)(图 3B); 3 号转化子阳性克隆子则有近 1 kb 目的插入片段(BmKbpp-EGFP)(图 3C)。测序结果验证 3 个重组表达载体 pGEX-5X-1/BmKbpp、pGEX-5X-1/EGFP 及 pGEX-5X-1/BmKbpp/EGFP 构建成功。

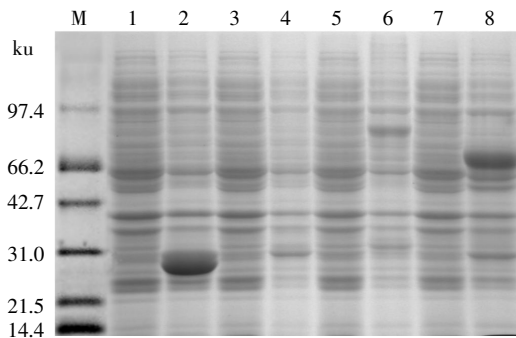


M: DNA Marker; 1: 回收的目的基因 DNA BmKbpp; 2, 4, 6, 7: 分别为重组质粒 pGEX-BmKbpp、pGEX-EGFP、pGEX-BmKbpp-EGFP 经 BamHI 和 XhoI 双酶切; 3, 5, 8: 分别为重组质粒 pGEX-BmKbpp、pGEX-EGFP、pGEX-BmKbpp-EGFP 经 BamHI 单酶切

图 3 重组表达载体 pGEX-BmKbpp(A)、pGEX-EGFP(B)和 pGEX-BmKbpp-EGFP 的酶切鉴定

2.3 BmKbpp 的原核表达及其在不同的融合表达状态下宿主菌的生长曲线测定

将 pGEX-5X-1、pGEX-BmKbpp、pGEX-BmKbpp-EGFP 和 pGEX-EGFP 分别转化到 Rossetta(DE3)表达菌株。以不同起始 OD₆₀₀ 值、不同的温度及加 5%~20% 不同量葡萄糖等多种表达条件优化试验,结果工程菌 pGEX-BmKBPP/Rossetta (DE3) 均未能表达目的蛋白 GST-BmKBPP(见图 4 中泳道 4),且在 IPTG 诱导后受体菌生长受到显著抑制。当 GST-BmKBPP-EGFP(重组载体 pGEX-BmKbpp-EGFP) 融合表达时,则可得少量融合蛋白的表达(见图 4 中泳道 6),但宿主菌的生长仍在很大程度上受到抑制。实验组中 GST 及融合蛋白 GST-EGFP 的表达及其宿主菌的生长状况良好。这些结果表明细菌的生长抑制是由 BmKBPP 引起的(图 4 和图 5),极少量 BmKBPP 蛋白表达(即使与 GST 和/或 EGFP 融合表达)均可抑制宿主菌生长。



1: GST/Rossetta(DE3)-未诱导; 2: GST/Rossetta(DE3)-诱导; 3: GST-BmKBPP/Rossetta (DE3)-未诱导; 4: GST-BmKBPP/Rossetta (DE3)-诱导; 5: GST-EGFP/Rossetta (DE3)-未诱导; 6: GST-EGFP/Rossetta (DE3)-诱导; 7: GST-BmKBPP-EGFP/Rossetta (DE3)-未诱导; 8: GST-BmKBPP-EGFP/Rossetta (DE3)-诱导

图 4 4 个表达质粒在 Rossetta(DE3) 中表达的 SDS-PAGE 检测结果

OD₆₀₀ 约为 0.9 时,对分别表达 GST-BmKBPP、GST-EGFP、GST-BmKBPP-EGFP 和 GST 蛋白的工程菌 pGEX-BmKBPP/Rossetta (DE3)、pGEX-EGFP/Rossetta (DE3)、pGEX-BmKBPP-EGFP/Rossetta (DE3) 及 pGEX/Rossetta (DE3) 进行诱导表达,测定 4 种转化菌的生长曲线(重复测定 3 次以上)。结果表明,插入 BmKbpp 基因片段的表达载体所转化受体菌均会不同程度地受到生长抑制(表 1 和图 5),其中与 EGFP 融合表达的宿主菌可能因为 EGFP 影响

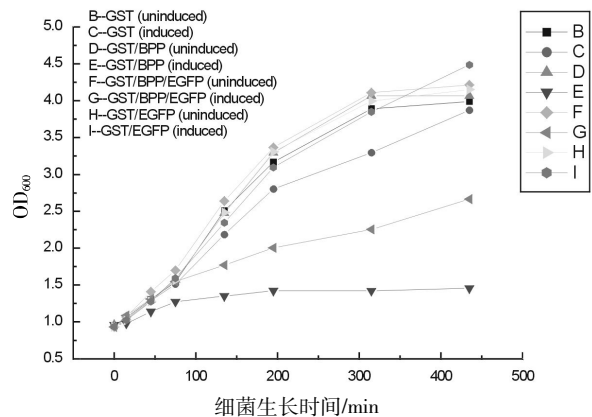


图 5 GST/Rossetta (DE3)、GST-BmKBPP/Rossetta (DE3)、GST-EGFP/Rossetta (DE3) 及 GST-BmKBPP-EGFP/Rossetta (DE3) 的生长曲线测定结果

OD₆₀₀ 值测定,使之偏高,但从抑菌趋势来看 GST-BmKBPP-EGFP 与 GST-BmKBPP 是一致的。

表 1 GST/Rossetta (DE3)、GST-BmKBPP/Rossetta (DE3)、GST-EGFP/Rossetta (DE3) 及 GST-BmKBPP-EGFP/Rossetta (DE3) 生长曲线测定中各时间点取样所对应的 OD₆₀₀ 值

时间/ min	OD ₆₀₀							
	B	C	D	E	F	G	H	I
0	0.946	0.946	0.96	0.96	0.932	0.932	0.934	0.934
15	1.056	1.04	1.06	0.978	1.068	1.086	1.018	1.022
45	1.305	1.287	1.299	1.14	1.41	1.311	1.278	1.275
75	1.54	1.512	1.572	1.272	1.7	1.548	1.564	1.592
135	2.51	2.185	2.475	1.35	2.64	1.77	2.485	2.345
195	3.168	2.802	3.294	1.422	3.366	2.004	3.306	3.096
315	3.892	3.297	4.067	1.421	4.109	2.254	3.997	3.85
435	3.99	3.871	4.067	1.456	4.214	2.667	4.151	4.487

注: B: GST/Rossetta (DE3)-未诱导; C: GST/Rossetta (DE3)-诱导; D: GST-BmKBPP/Rossetta (DE3)-未诱导; E: GST-BmKBPP/Rossetta (DE3)-诱导; F: GST-EGFP/Rossetta (DE3)-未诱导; G: GST-EGFP/Rossetta (DE3)-诱导; H: GST-BmKBPP-EGFP/Rossetta (DE3)-未诱导; I: GST-BmKBPP-EGFP/Rossetta (DE3)-诱导。

生长曲线测定结果初步确定 BmKBPP 是一个蝎抗菌肽分子,且具有较强的抑菌功能,即便与 GST 融合表达,甚至夹于 GST 和 EGFP 间融合表达都能抑制宿主菌的生长。

3 讨论

毒素动物的毒腺能分泌产生大量毒素及有毒物质,主要成分为蛋白质或多肽,用于捕食和防

御。蝎尾腺毒液是一个丰富的生物活性小分子多肽库,传统蝎毒素主要由具 3~4 对二硫键,长度为 23~70 氨基酸的离子通道毒素组成,分别作用于可兴奋性或非兴奋性细胞膜上的 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 及 Ca^{2+} 通道^[20]。近年来,研究发现蝎尾腺毒液存在大量无二硫键蝎毒液多肽(NDBPs)^[18,21],长度为 13~50 氨基酸,相互之间同源性较低。这些数量巨大的蝎毒液活性多肽是潜在的重要药物开发资源。在蝎 NDBPs 中,除 Peptide T 和 Peptide K12 等电点(pHi)值接近中性外,其余 pHi>9 或 < 3.5^[18]。研究表明, pHi>9 蝎 NDBPs 一般具抗菌肽功能^[16,18]。

抗菌蛋白体外活性检测结果表明,抗菌肽的抗菌浓度一般为数微摩尔到数百微摩尔之间^[3,16]。各种抗菌肽因其氨基酸组成、序列长度及结构的不同而出现抗菌谱的差异,因此对不同的抗菌肽的功能研究是十分必要的。抗菌蛋白在生物组织中含量少,分离获得大量天然产物困难很大,人工合成较大分子量的抗菌肽则成本高,容易被蛋白酶降解,这些都限制了对抗菌肽的研究。抗菌肽功能研究、作用机理研究及构效关系研究均需获得大量抗菌肽蛋白。基因工程生产抗菌肽是一个较好的选择^[22],但抗菌肽基因表达产物对宿主菌有害,因此通常采用融合表达方式来获得。

本研究通过生物信息方法分析认为 BmKBPP 是一个抗菌肽分子,并通过抑菌生长曲线测定初步证实 BmKbpp 基因所编码多肽 BmKBPP 具有较强的抑菌功能。在原核表达系统中 BmKBPP 与 GST 进行融合表达仍然对大肠埃希菌宿主有很强的毒性;将 GST、BmKBPP 及 EGFP 3 个蛋白一起融合表达时,诱导表达后宿主细胞的生长仍受到很大程度的抑制,但能得到少量蛋白的表达。为了研究抗菌肽 BmKBPP 的功能、构效关系及作用机理,需要获得大量 BmKBPP 蛋白,笔者进行了原核和真核表达探索。在 GST-BmKBPP 之后再融合一个同样来源于东亚钳蝎的强酸性多肽 KN2 后^[17],得到融合蛋白的成功表达(另文发表)。另外,也实现了融合蛋白 GST-BPP 在酵母菌 GS115 中分泌表达成功,抗菌肽 BmKBPP 的分离、纯化及详细的功能研究正在进行。笔者研究表明,BmKBPP 是一个具有很强抑菌功能的抗

菌肽,通过适当的融合表达方式可以获得抗菌肽 BmKBPP,这将为后续的功能研究和应用研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Yount N Y, Yeaman M R. Emerging themes and therapeutic prospects for anti-infective peptides [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012, 52: 337-360.
- [2] Yuan W, Cao L, Ma Y, et al. Cloning and functional characterization of a new antimicrobial peptide gene StCT1 from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus* [J]. *Peptides*, 2010, 31(1): 22-26.
- [3] Dai C, Ma Y, Zhao Z, et al. Mucroporin, the first cationic host defense peptide from the venom of *Lychas mucronatus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(11): 3967-3972.
- [4] Klevens R M, Morrison M A, Nadle J, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States [J]. *Jama*, 2007, 298(15): 1763-1771.
- [5] Appelbaum P C. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2006, 12 (Suppl 1): 16-23.
- [6] Shea K M. Antibiotic resistance: what is the impact of agricultural uses of antibiotics on children's health? [J]. *Pediatrics*, 2003, 112(1): 253-258.
- [7] Fischbach M A, Walsh C T. Antibiotics for emerging pathogens [J]. *Science*, 2009, 325(5944): 1089-1093.
- [8] Wang J, Wong E S, Whitley J C, et al. Ancient antimicrobial peptides kill antibiotic-resistant pathogens: Australian mammals provide new options [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e24030.
- [9] Metz-Boutigue M H, Shooshtarizadeh P, Prevost G, et al. Antimicrobial peptides present in mammalian skin and gut are multifunctional defence molecules [J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(9): 1024-1039.
- [10] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms [J]. *Nature*, 2002, 415(6870): 389-395.
- [11] Zhao Z, Ma Y, Dai C, et al. Imcroporin, a new cationic antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(8): 3472-3477.
- [12] Mygind P H, Fischer R L, Schnorr K M, et al. Plec-tasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential

- from a saprophytic fungus [J]. *Nature*, 2005, 437 (7061): 975–980.
- [13] Nicolas P. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides[J]. *Febs J*, 2009, 276(22): 6483–6496.
- [14] Steinstraesser L, Kraneburg U, Jacobsen F, et al. Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality[J]. *Immunobiology*, 2011, 216(3): 322–333.
- [15] Koczulla A R, Bals R. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential[J]. *Drugs*, 2003, 63 (4): 389–406.
- [16] Moerman L, Bosteels S, Noppe W, et al. Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa[J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(19): 4799–4810.
- [17] Zeng X C, Wang S X, Zhu Y, et al. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch[J]. *Peptides*, 2004, 25(2): 143–150.
- [18] Zeng X C, Corzo G, Hahin R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges[J]. *IUBMB Life*, 2005, 57(1): 13–21.
- [19] Zeng X C, Li W X, Peng F, et al. Cloning and characterization of a novel cDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide (BmKbpp) related to a bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch[J]. *IUBMB Life*, 2000, 49(3): 207–210.
- [20] Luo F, Zeng X C, Hahin R, et al. Genomic organization of four novel nondisulfide-bridged peptides from scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: gaining insight into evolutionary mechanism[J]. *Peptides*, 2005, 26 (12): 2427–2433.
- [21] Diego-Garcia E, Batista C V, Garcia-Gomez B I, et al. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function [J]. *Toxicon*, 2005, 45 (3): 273–283.
- [22] Fan F, Wu Y, Liu J. Expression and purification of two different antimicrobial peptides, PR-39 and Protegrin-1 in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expr Purif*, 2010, 73(2): 147–151.

Prokaryotic Expression and Functional Characterization of Scorpion Toxins Gene BmKbpp from *Buthus Martensii* Karsch

LUO Feng, LI Zheng, FAN Li-mei, LIANG Yong, LIN Yan, JIANG Lin

(School of Medicine, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei, China)

Abstract: Primary structure analyzing and secondary structure predicting indicate that BmKBPP of NDBPs (Non-Disulfide-Bridged Peptides) might be a polycovalent cationic host defense peptide, which has a typical structure of amphiphilic α -helix and plenty of basic amino acids(Arg and Lys)with net positive charges. Using PCR method and plasmid vector pGEX-5X-1, the recombinant expression vectors of BmKbpp, EGFP and BmKbpp/EGFP prokaryotically fused with GST were constructed. These three expression vectors and pGEX-5X-1 were transformed into Rossetta (DE3) strains, respectively. Expression of BmKbpp gene in *E. coli* demonstrates that its product has antimicrobial function by testing the living curve of host cell. Although the fusing products of genes is toxic to host cell, the slight fusion expression of GST, BmKBPP and EGFP is successful, which provides us a way to obtain BmKBPP for further functional research.

Key words: scorpion toxins; antimicrobial peptides; BmKbpp; prokaryotic expression

(责任编辑: 陈 旷)