

## 两种水生动物抗菌肽的原核表达及活性分析

舒梅 许杨\* 徐熙 涂迨

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室南昌大学中德联合研究院 南昌 330047)

**摘要** 将两种水生动物分泌的抗菌肽基因克隆到原核表达载体 pGEX-4T-1 上,构建了 pGEX-Y18 和 pGEX-CEC1 两个融合蛋白表达载体,转化至 *E. coli* Rosetta 中进行表达,表达的融合蛋白主要以包涵体形式存在。融合蛋白经复性、酶切处理获得抗菌肽 Y18 和 CEC1。抑菌实验结果表明:融合蛋白 GST-Y18 和 GST-CEC1、抗菌肽 Y18 和 CEC1 都能有效地抑制 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*S. aureus*、*B. subtilis* 和 *S. cerevisiae* 的生长。

**关键词** 抗菌肽 融合蛋白 包涵体 抑菌活性

**中图分类号** Q786

抗菌肽是由多种生物细胞特定基因编码,经外界条件诱导产生的一类具有广谱抗细菌、真菌、病毒、原虫、抑杀肿瘤细胞等活性作用的多肽<sup>[1-2]</sup>。抗菌肽广泛地存在于细菌、植物、昆虫、哺乳动物、两栖动物、鱼类、软体动物以及甲壳类动物中,其相对分子质量小,由 12~100 个氨基酸组成;热稳定性高,一些肽类在 100℃ 加热 10~15 min 仍能保持其一定的活性;对较大的离子强度和 pH 值均具有较强的耐受性;部分抗菌肽能够耐胰蛋白酶或胃蛋白酶水解。抗菌肽是天然免疫防御系统的一个重要组成部分被称为“第二防御体系”<sup>[3]</sup>。

在软体类、甲壳类水生生物及硬骨鱼类中,抗菌肽是由多基因家族所编码,通过研究这些在不同组织中由不同的基因家族所编码的抗菌肽的生物学活性及表达谱,有助于逐步认识抗菌肽作用机制及意义<sup>[4]</sup>。鱼类抗菌肽氨基酸序列同源性低,但结构上具有一定的共性,如含有较多赖氨酸、精氨酸等疏水氨基酸,分子内易形成  $\alpha$  螺旋结构等。鱼类抗菌肽可分为以下几类:(1)不含半胱氨酸形成  $\alpha$  螺旋结构,该类抗菌肽能折叠成疏水或双亲性  $\alpha$  螺旋结构,有利于其穿透细菌细胞膜,产生直接抗菌活性<sup>[5]</sup>;(2)含多个半胱氨酸形成  $\beta$  折叠结构,该类抗菌肽是在分子内有 2 个或 2 个以上二硫键,与哺乳动物中发现的 corticostatin 或 defensin 具有相似性;(3)与组蛋白高度相似的组蛋白样蛋白;

(4)环链结构类,该类抗菌肽在 C 末端有一个分子内二硫键形成一个环链结构,而 N 末端为线状结构<sup>[6]</sup>。

鱼类抗菌肽的杀菌机理<sup>[7-8]</sup>有以下四种,(1)桶板模型<sup>[9]</sup>:抗菌肽结合在细胞膜表面,将疏水基团插到磷脂双分子层,造成细胞质物质泄漏和电化学势丧失,细胞膜崩解而导致细胞死亡,达到抑菌效果。(2)地毯模型<sup>[10]</sup>:某些具有双亲性  $\alpha$  螺旋结构的抗菌肽利用疏水作用和分子张力作用改变细胞膜的表面张力,从而在细胞膜上出现暂时的孔洞,细胞液相互渗透并且抗菌肽还可由此孔洞进入细胞,从而起到杀菌作用。(3)穿孔螺旋模型:抗菌肽分子的极性端与磷脂分子的极性端相对一起形成螺旋状并连续翻转,从而导致膜的完整性破坏和功能丧失;(4)分子团聚集式:抗菌肽分子以不规则形式聚集于膜表面,形成跨膜电势差而导致膜损伤。(5)其他作用机制<sup>[11]</sup>:抗菌肽在经过静电作用穿透细胞膜之后,可以与膜分离,进入到细胞质内部,然后与细胞内部物质如 DNA、RNA、某些酶等结合,从而破坏细胞正常功能。

目前,抗菌肽可通过 3 种途径获得:(1)从生物体内提取纯化;(2)化学人工合成;(3)构建基因工程抗菌肽菌株。生物体内含量非常低,提取时操作复杂,产率低;而化学合成成本太高,副产物多,都不能满足实际需求,利用基因工程成本低,操作相对简单,因此能实现大规模生产抗菌肽。本研究成功表达了两种水生动物抗菌肽的融合蛋白,利用凝血酶酶切获得抗菌肽

收稿日期:2010-08-16 修回日期:2011-01-16

\* 通讯作者,电子信箱:xuyang1951@yahoo.com.cn

单体,并对融合蛋白和抗菌肽单体进行活性分析,研究其抗菌活性,发现 GST-CEC1、GST-Y18 和抗菌肽单体均能有效抑制 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*S. aureus*、*B. subtilis* 和 *S. cerevisiae* 的生长。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 质粒及菌株 目的基因 Y18、CEC1 由台湾海洋大学陆振刚教授惠赠,pGEX-4T-1 购自 Novagen 公司,

*E. coli* DH5 $\alpha$  和 *E. coli* Rosetta 为本实验室保存。

1.1.2 试剂 GST-Bind Resin 购自 Novagen 公司;primeSTAR Taq、T4 连接酶、以及各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;凝血酶购于 Sigma 公司;Tricine 购自上海生工生物工程技术有限公司;超低分子量蛋白质 Marker 购自北京索来宝生化公司;胶回收纯化试剂盒和质粒小提试剂盒均购自天根生物科技公司;其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 缓冲液体系 缓冲液体系的种类和配方见表 1。

表 1 缓冲体系的配方  
Table 1 The prescription of buffer

洗涤缓冲液	溶解缓冲液	复性缓冲液
20mmol/L Tris-HCl, pH7.8 0.3mol/L NaCl 1mmol/L EDTA 1% (V/V) TritonX-100 1mol/L Urea	50mmol/L Tris-HCl, pH7.8 5mmol/L MgCl <sub>2</sub> 2.5mmol/L $\beta$ -mercaptoethanol 0.1% (w/v) Tween 20	50mmol/L Tris-HCl, pH8.0 0.4mol/L L-Arginine, 2mmol/L DTT 0.5mol/L NaCl

1.1.4 引物 根据融合蛋白 GST 基因和目的基因 CEC1、Y18 序列设计并合成下列引物,下划线部分表示 BamH I 或 Xho I 酶切位点。

PFA1- *Bam*H I 5'-GCCGCGATCCATGCTGCTCTCTTATGTGCAT-3'

PRA2- *Xho* I 5'-CCGCTCGAGTTATTAGAGGGCTTGGCTTCTCC-3'

PFA3- *Bam*H I 5'-CGCGGATCCATGTACCCCTCCAACCG-3'

PRA4- *Xho* I 5'-CCGCTCGAGTTATTAATATCTCTGCCTGGTGATGAG-3'

1.2 方 法

1.2.1 预测抗菌肽 CEC1、Y18 的可能结构 结合分子模型和分子动力学分析,采用 Easy Modeller V 2.0 软件,预测两种天然水生动物抗菌肽的可能结构及作用模式。

1.2.2 pGEX-Y18、pGEX-CEC1 表达载体的构建 以含有目的基因 Y18、CEC1 的质粒为模板,利用 1.1.4 节中设计的两对引物进行 PCR 扩增。PCR 产物经割胶纯化回收后,经 BamH I 和 Xho I 双酶切;载体 pGEX-4T-1 用相同的酶双酶切、纯化。将纯化后的 PCR 产物与线性化的载体 pGEX-4T-1 连接,然后通过电转化法转入 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,将酶切及 PCR 鉴定为阳性的重组质粒送天根公司测序,得到重组表达载体 pGEX-Y18 和 pGEX-CEC1,(图 1)。

1.2.3 Y18 和 CEC1 融合蛋白的诱导表达 将阳性重组质粒 pGEX-Y18 和 pGEX-CEC1 通过 CaCl<sub>2</sub> 转化法转化至 *E. coli* Rosetta,用含有 100 $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB (Luria-Bertani) 平板筛选。将获得的工程菌株接种于 5 ml 含有 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C, 220r/min 振荡培养过夜。将过夜培养物按 1% 比例接种于 100ml 含有 100 $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 220 r/min 培养。当吸光度 A<sub>600</sub> 达到 0.6 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,于 37 $^{\circ}$ C 进行诱导培养 8 h,4000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 PBS (phosphate-buffer saline, pH 7.3) 缓冲液洗涤 2 次,然后用 PBS 重悬菌体,在冰浴中用超声破碎菌体,将破碎液于 4 $^{\circ}$ C,10000 r/min 离心 20 min,收集上清和沉淀。用 12% SDS-PAGE 检测融合蛋白的表达情况。

1.2.4 CEC1 和 Y18 融合蛋白的纯化和酶切 用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤上清,将其加入已经用平衡液平衡好的 GST-Bind 亲和柱,流速 0.4 ml/min,用 10 倍体积 PBS 洗去杂蛋白,然后用 1 倍体积 GST 洗脱液 (50mmol/L Tris-HCl,10 mmol/L 还原型谷胱甘肽,pH8.0) 洗脱目的蛋白,将收集的蛋白用 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 进行透析与浓缩,然后利用凝血酶 22~25 $^{\circ}$ C 进行酶切 16 h。用 Tricine-SDS-PAGE 检测蛋白酶切情况。

1.2.5 Y18 和 CEC1 融合蛋白的复性与酶切 参考文献[12]中描述的方法将 1.2.3 节中收集的沉淀用洗涤

缓冲液洗涤 1 次, 4℃, 10000 r/min 离心 20 min, 收集沉淀。所得沉淀用无菌水洗涤 5 次, 每次洗涤后均在 4℃ 下 10000 r/min 离心 10 min。包涵体用溶解缓冲液溶解, 室温放置在水平摇床上 1 h。4℃, 10000 r/min 离心 20 min, 收集上清液。按照体积比 1:20 倍将溶解液

逐滴加入复性缓冲液, 并不断搅拌, 4℃ 放置 24 h 复性。用 3000 目的透析袋透析除盐。取 500 μl 目的蛋白到离心管中, 加入 10 μl 凝血酶 (1U/μl), 22~25℃ 进行酶切 16 h。用 Tricine-SDS-PAGE 检测蛋白酶切情况。

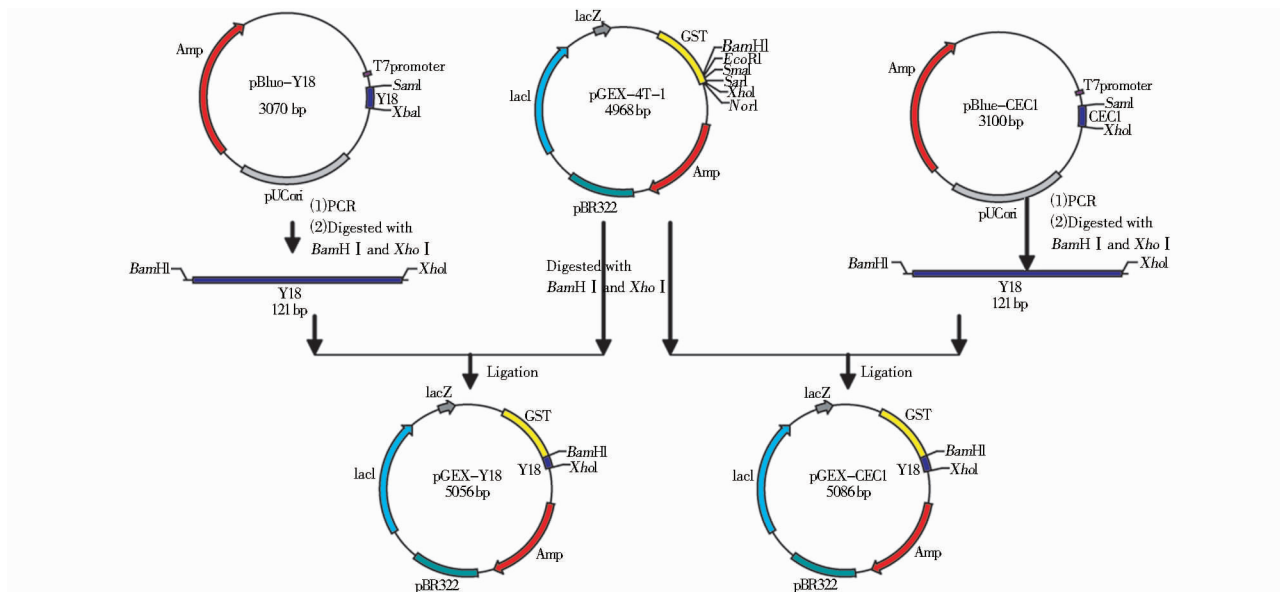


图 1 融合蛋白表达载体 pGEX-Y18 和 pGEX-CEC1 构建过程

Fig. 1 Construction of the fusion protein expression vector pGEX-Y18 and pGEX-CEC1

1.2.6 体外抗菌肽活性测定 采用管碟法作为检测抗菌肽抑菌活性的标准方法, 分别取 50 μl 对数期的大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* Rosenbach)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 与 5ml、50℃ 左右的 0.7g/dl 琼脂糖 LB 充分混和, 倒入已有下层培养基的平板中。待冷却后在培养基表面垂直放上牛津杯, 往杯中加入 51.2 μg 复性酶切后的抗菌肽 (100 μl, 0.512mg/ml) 放置 2~3h 后 37℃ 培养 12h。

## 2 结果

### 2.1 抗菌肽 CEC1、Y18 的可能结构及作用模式

从水生动物中克隆的两种抗菌肽基因, 采用软件分析预测结果如图 2、图 3, 由 Y18 结构可推知其主要形成柱状构象并富含疏水氨基酸, 因此极可能有效地插入细胞膜内, 以桶板模型机制破坏细胞造成凋亡。CEC1 其结构与 Y18 非常类似, 因此可能采用同样的机制对目的细胞造成损伤。

### 2.2 融合蛋白表达载体的构建和鉴定

选取经菌落 PCR 初步验证为阳性的克隆子, 提取

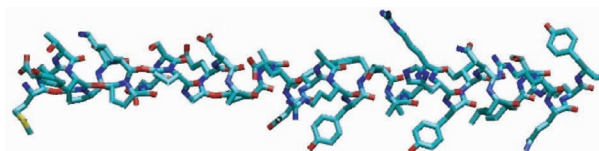


图 2 Y18 的空间模型

Fig. 2 The spatial model of Y18

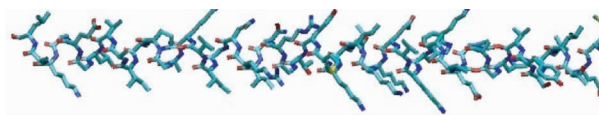


图 3 CEC1 的空间模型

Fig. 3 The spatial model of CEC1

质粒, 用 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切验证, 琼脂凝胶电泳检测结果见图 4。由图 4 可见 pGEX-Y18 和 pGEX-CEC1 与空载体 pGEX-4T-1 都分别切出了 2 条片段, 其中一条片段大小均为 3970bp, 另一条片段大小分别约为 1110bp、1140bp、1000bp, 重组质粒 pGEX-Y18 和 pGEX-CEC1 比空载体大的片段符合外源 DNA 分子量大小。测序结果与预期一致, 证明表达载体 pGEX-Y18 和

pGEX-CEC1 构建正确。

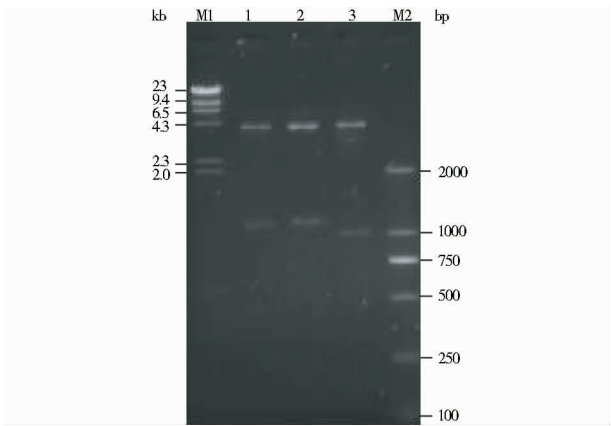


图 4 2 个重组表达质粒双酶切鉴定电泳结果

Fig. 4 Identification of the two recombinant plasmids by electrophoresis

M1:  $\lambda$ -Hind III digest DNA marker; M2: DL2000 marker; 1: pGEX-Y18 recombinant plasmid digested by BamH I and Pst I; 2: pGEX-CEC1 recombinant plasmid digested by BamH I and Pst I; 3: pGEX-4T-1 plasmid digested by BamH I and Pst I

2.3 两种融合蛋白的诱导表达

将重组质粒转化至 *E. coli* Rosetta 中,经 SDS-PAGE 电泳检测两种抗菌肽的表达,结果如图 5 所示,含有 pGEX-Y18、pGEX-CEC1 表达载体的 *E. coli* Rosetta 经 IPTG 诱导后,分别表达了大小约为 30kDa、29kDa 的条带,而含有空载体 pGEX-4T-1 对照培养物液中有 1 条约 26kDa 的 GST 蛋白质条带,说明目的基因在宿主细胞中得到了表达。同时,发现融合蛋白质大部分分布在沉淀中,由此认为融合蛋白质主要以包涵体形式表达。

2.4 融合蛋白上清的纯化与凝血酶酶切

采用 GST-Bind 亲和柱纯化这两种抗菌肽,纯化的融合蛋白经凝血酶酶切,采用 Tricine-SDS-PAGE 检测蛋白纯化、酶切的效果。结果如图 6 所示,分别在 30kDa、29kDa 有明显的蛋白质条带,经酶切后,在 26kDa 处有一条带,说明采用 GST-Bind 亲和柱纯化得到融合蛋白,并且剪切效果比较好,但抗菌肽单体那条带未见。

2.5 包涵体的复性与凝血酶酶切

将包涵体沉淀进行洗涤、溶解、复性,再经凝血酶酶切,采用 Tricine-SDS-PAGE 检测蛋白复性、酶切的效果。结果如图 7 所示,两种抗菌肽复性后,分别在 30kDa、29kDa 有明显的蛋白质条带,经酶切后,在

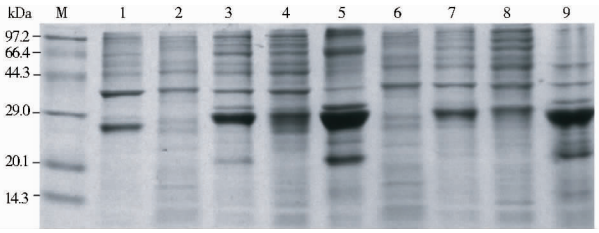


图 5 融合蛋白 GST-Y18、GST-CEC1 的 SDS-PAGE 结果

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the GST-Y18、GST-CEC1 fusion protein expressed in *E. coli*

M: Protein molecular weight marker (low); 1: The whole protein of pGEX-4T-1 after induction; 2: The whole protein of pGEX-Y18 without induction; 3: The whole protein of pGEX-Y18 after induction; 4: The supernatant of pGEX-Y18 after induction; 5: The precipitation of pGEX-Y18 after induction; 6: The whole protein of pGEX-YCEC1 without induction; 7: The whole protein of pGEX-CEC1 after induction; 8: The supernatant of pGEX-CEC1 after induction; 9: The precipitation of pGEX-CEC1 after induction

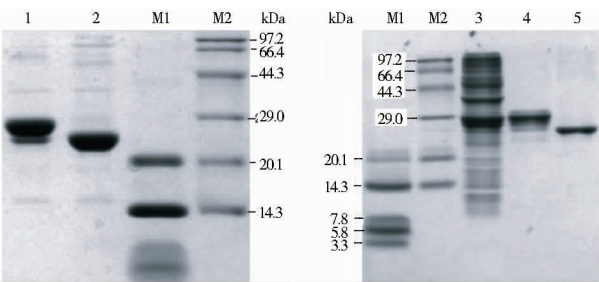


图 6 纯化 GST-Y18、GST-CEC1 融合蛋白的 Tricine-SDS-PAGE 结果

Fig. 6 Tricine-SDS-PAGE analysis of purified GST-Y18、GST-CEC1 fusion protein

M1, M2: Protein molecular weight marker (low); 1: Purified GST-Y18 protein; 2: The digestion of GST-Y18 protein; 3: The supernatant of pGEX-CEC1 after induction; 4: Purified GST-CEC1 protein; 5: The digestion of GST-CEC1 protein

26kDa 处多出一条带,说明融合蛋白明显被切开,获得抗菌肽单体。

2.6 两种抗菌肽抗菌活性的检测

将纯化和复性后的融合蛋白 GST-Y18、GST-CEC 和经酶切获得的抗菌肽 Y18、CEC1 对细菌进行体外抑菌分析结果(图 8)显示:复性缓冲液和 GST 周围的细菌能正常生长,而抗菌肽 Y18、CEC1 以及复性 GST-Y18、GST-CEC1 周围的细菌有不同程度的抑制,形成了抑菌圈,证明抗菌肽 Y18、CEC1 以及复性 GST-Y18、



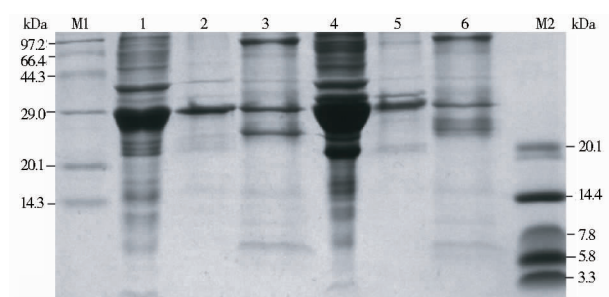


图7 复性 GST-Y18、GST-CEC1 融合蛋白的  
Tricine-SDS-PAGE 结果

Fig. 7 Tricine-SDS-PAGE analysis of renatured  
GST-Y18、GST-CEC1 fusion protein

M1、M2: Protein molecular weight marker (low); 1: The precipitation of pGEX-Y18 after induction; 2: The refolding of GST-Y18 fusion protein; 3: The digestion of GST-Y18 fusion protein; 4: The precipitation of pGEX-CEC1 after induction; 5: The refolding of GST-CEC1 fusion protein; 6: The digestion of GST-CEC1 fusion protein

GST-CEC1 均抑制细菌的生长。而纯化后的融合蛋白以及经酶切的产物都不能抑制菌的生长(未上图)。

### 3 讨论

本文成功表达了两种水生动物分泌的抗菌肽 Y18 和 CEC1, 其中 Y18 序列与野鸽的神经肽 Y 序列有 97% 同源性, CEC1 序列与天蚕抗菌肽序列同源性 92%, 与鱼类抗菌肽序列同源性低, 目前对这两种抗菌肽的研究未见报道。抗菌肽相对分子质量小、肽链结构简单, 因此利用基因工程方法生产抗菌肽是个比较好的选择。当我们尝试将抗菌肽直接进行表达时, 发现构建的工程菌生长十分缓慢, 目的产物经 Tricine-SDS-PAGE 检测和活性检测, 均未检测到, 这可能是由于抗菌肽在大肠杆菌中直接表达, 对大肠杆菌本身具有毒性和表达水平比较低。这就需要我们采用融合表达方式(形成融合蛋白或构建串联多聚体)表达抗菌肽, 以产生对宿主细胞毒害较小的蛋白形式表达并积累。

目前报道作为抗菌肽的融合载体蛋白有大肠杆菌的 RepA 蛋白、大肠杆菌 PurF 蛋白的 F4 片段、GST(谷胱甘肽)、Trx(硫氧还原蛋白)、ELPS(类弹性蛋白)、EDDIE(自我剪切蛋白)<sup>[13]</sup> 等。并且采用融合表达时, 许多重组蛋白的产物往往是以包涵体的形式存在, 我们尝试采用 GST 树脂纯化这两种抗菌肽上清, 成功纯化到融合蛋白, 并且剪切比较完全, 但未检测出活性。

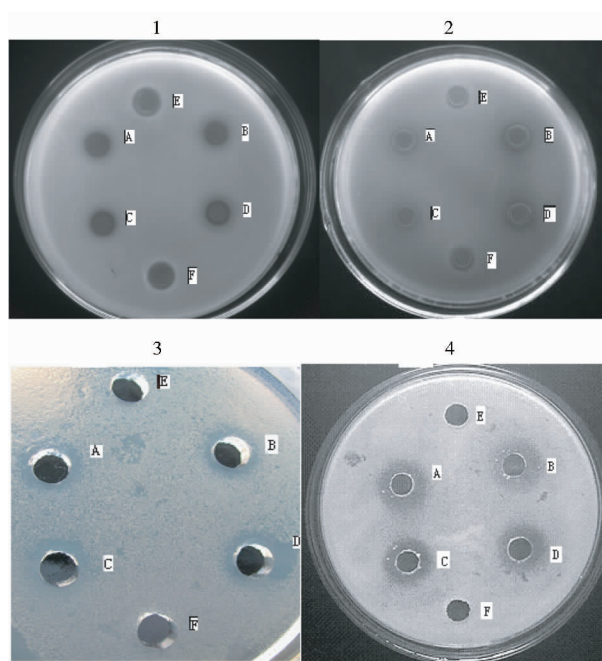


图8 抗菌肽的抑菌结果

Fig. 8 Inhibitory activity of the antimicrobial

A: The refolding of GST-Y18 fusion protein; B: The mixture of fusion protein GST-Y18, GST, Y18;  
C: The refolding of GST-CEC1 fusion protein; D: The mixture of fusion protein GST-CEC1, GST, CEC1; E: refolding buffer; F: The protein of GST

这可能由于诱导表达时, 可溶性产物一直轻微抑制宿主菌的生长, 或有效的可溶性产物表达量较低或酶切的位点不正确导致抗菌肽没有活性。由于可溶性抗菌肽未检测到活性, 我们尝试对包涵体复性, 并检测活性。另外包涵体较易纯化, 只需要简单的差速离心及洗涤等就可以得到较高纯度的目的蛋白质, 这样使大量并经济地制备抗菌肽成为可能。路妍等<sup>[14]</sup> 成功表达了 GST-Rs-AFP<sub>2</sub>, 复性后的融合蛋白能直接抑制不同病原菌的生长。本研究采用凝血酶剪切了复性后的融合蛋白, 与其他研究报道<sup>[15]</sup> 一样存在剪切不完全的问题; 同时检测了抗菌肽剪切前后的活性, 实验结果是剪切前后均有活性。该结果为后续的将抗菌肽基因序列串联克隆以融合蛋白或串联单体的形式高量表达实验奠定了良好的基础。

### 参考文献

- [1] Steiner H, Hultmark D, Enqstrom A, et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 1981, 292 (5820): 246-248.

- [ 2 ] Rathinakumar R, Walkenhorst W F, Wimley W C, et al. Broad-spectrum antimicrobial peptides by rational combinatorial design and high-throughput screening: the importance of interfacial activity. *J Am Chem Soc*, 2009, 131 ( 22 ) :7609-7617.
- [ 3 ] Huang W S, Li S Q, Cai L, et al. Cloning, sequence analysis and gene organization of antimicrobial peptide hepcidin gene from Nile Tilapia ( *Oreochromis niloticus* ). *JXMU Natural Science*, 2007, 46(3) :390-395.
- [ 4 ] Basanez G, Shinnar AE, Zimmerberg J. Interaction of hagfish cathelicidin antimicrobial peptides with model lipid membranes. *FEBS Lett*, 2002, 532(1-2) :115-120.
- [ 5 ] Pukala T L, Bowie J H, Masell V M, et al. Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure. *Nat Prod Rep*, 2006, 23 ( 3 ) : 368-393.
- [ 6 ] Douglas Susan E, Patrzykat Aleksander. Identification, structure and differential expression of novel pleurocidins clustered on the genome of the winter flounder, *pseudopleuronectes americanus*. *Eur J Biochem*, 2003, 270(18) 3720-3730.
- [ 7 ] Reddy K V, Yedery R D, Aranha C, et al. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents*, 2004, 24 ( 6 ) :536-547.
- [ 8 ] Lai Y, Gallo R L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol*, 2009, 30 ( 3 ) : 131-141.
- [ 9 ] Oren Z, Shai Y. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. *Biochemistry*, 1996, 237(1) : 303-310.
- [ 10 ] Pouny Y, Rapaport D. Interaction of Antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry*, 1992, 31(49) :12416-12423.
- [ 11 ] Paul Y, Kassebaum C, Lazarovici P, et al. Translocation of acylated pardaxin into cells. *FEBS Lett*, 1998, 440 ( 122 ) :131-134.
- [ 12 ] Liu B, Lu Y, Zhang Z, et al. Identification and antifungal assay of a wheat  $\beta$ -1, 3-glucanase. *Biotech Lett*, 2009, 31 ( 7 ) : 1005-1010.
- [ 13 ] 陆海荣, 李国栋, 吴宏宇, 等. 抗菌肽 GK1 在大肠杆菌中的融合表达. *生物工程学报*, 2008, 24(1) :21-26.  
Lu H R, Li G D, Wu H Y, et al. *Chin J Biotech*, 2008, 24(1) :21-26.
- [ 14 ] 路妍, 刘宝业, 井金学, 等. 抗菌肽 Rs-AFP2 的原核表达及抑菌活性. *植物遗传资源学报*, 2010, 11(1) :84-88.  
Lu Y, Liu B Y, Jin J X, et al. *JPGR*, 2010, 11 ( 1 ) : 84-88.
- [ 15 ] 张贞, 柯涛, 周玉玲, 等. 利用融合蛋白 EDDIE 在大肠杆菌中高效表达抗菌肽 Cecropin AD. *生物工程学报*, 2009, 25(8) : 1247-1253.  
Zhang Z, Ke T, Zhou Y L, et al. *Chin J Biotech*, 2009, 25(8) : 1247-1253.

## Expression and Activity Analysis of Two Anti-microbial Peptides from Aquatic Animals

SHU Mei XU Yang XU Xi TU Zhui

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Sino-Germany Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract** Anti-microbial peptides sequence from two kinds of aquatic animals have been cloned into the prokaryotic expression vector pGEX-4T-1, constructing two fusion protein expression vector pGEX-Y18 and pGEX-CEC1, which were transformed into *Escherichia coli* Rosetta to express, and the existent form of expression fusion protein mainly in inclusion body. Fusion protein was renatured, and cleaved to produce antimicrobial peptides Y18 and CEC1. Antimicrobial tests showed that not only fusion protein GST-Y18 and GST-CEC1 but also antimicrobial peptide Y18 and CEC1 can effectively restrain the growth of *E. coli* DH5 $\alpha$ , *S. aureus*, *B. subtilis*. and *S. cerevisiae*.

**Key words** Anti-microbial peptides Fusion protein Inclusion Antibacterial activity