



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Functional Expression and Purification of the Disulfide Bond-dependent Antimicrobial Peptide, Royalisin, via Artificial Oil Bodies 【Research report】

蜂王漿中雙硫鍵抗菌蛋白質 - 王漿抗菌蛋白的功能性表達與純化【研究報告】

Jun-Ming Tseng¹, and Chi-Chung Peng^{2*}

曾俊銘¹、彭及忠^{2*}

*通訊作者E-mail: bocky@sunws.nfu.edu.tw

Received: 2009/08/14 Accepted: 2009/10/16 Available online: 2009/10/01

Abstract

Royalisin is an antibacterial peptide previously isolated from the royal jelly of *Apis mellifera*. This peptide is toxic against a broad range of gram-positive bacteria, gram-negative bacteria and fungi. Royalisin contains 51 amino acid residues with 6 cysteine residues forming three intramolecular disulfide linkages, which may form a compact globular structure exhibiting high stability at low pH and high temperature. In this study, royalisin was overexpressed in *Escherichia coli* AD494 (DE3) as a recombinant protein fused with the C-terminus of oleosin by a linker polypeptide, intein *S*. Artificial oil bodies (AOBs) were reconstituted with triacylglycerol and phospholipid to obtain the insoluble recombinant protein. Royalisin was subsequently released from artificial oil bodies through self-splicing of intein induced by temperature alteration, and the recombinant royalisin was collected in the supernatant after centrifugation. Recombinant royalisin released from artificial oil bodies was folded to the optimal structure with its three intracellular disulfide bonds and exhibited high antibacterial activity. These results showed that the functional antibacterial peptide, royalisin, was successfully expressed and purified via the efficient AOB expression/purification system.

摘要

王漿抗菌蛋白 (royalisin) 為蜜蜂工蜂下咽頭腺 (hypopharyngeal glands) 分泌的抗菌勝肽，其由 51 個胺基酸所組成，大小為 5.5 KDa，其中有 6 個半胱胺酸 (cysteine) 組成三個分子內的雙硫鍵，而雙硫鍵可以提供一個緊密、穩定的球狀結構，因此在低 pH 和高溫處理下都可以保持結構及活性穩定。王漿抗菌蛋白在低濃度下 (1 μM) 具有抗菌殺菌的能力，主要可抗真菌、革蘭氏陽性菌及少數的革蘭氏陰性菌。在本研究中，將王漿抗菌蛋白成熟勝肽片段融合至油體膜蛋白 C 端，中間以蛋白質剪接子 (intein) 連接構築成為融合蛋白質 (fusion protein) 基因，並藉由大腸桿菌 AD494 大量表現。將重組後的融合蛋白與三酸甘油脂、磷脂質混合後，重組產生人造油體 (artificial oil body, AOB)；藉由溫度轉換，讓中間連接的 intein 可以自發性的誘導斷裂，使 AOB 上的王漿抗菌蛋白被釋放至水層。所釋放出的王漿抗菌蛋白經蛋白質電泳膠位移分析發現它具有分子內雙硫鍵並正確折疊，且有抗菌活性，顯示本研究成功地利用人造油體蛋白質純化系統表達及純化具高抗菌活性的王漿抗菌蛋白。

Key words: royalisin, antimicrobial peptides, royal jelly, *Apis mellifera*, AOB expression/purification system

關鍵詞: 王漿抗菌蛋白、抗菌蛋白、蜂王漿、西洋蜂、人造油體。

Full Text: [PDF\(0.68 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

蜂王漿中雙硫鍵抗菌蛋白質－王漿抗菌蛋白的功能性表達與純化

曾俊銘¹、彭及忠^{2*}

¹ 國立中興大學生物科技學研究所 40227 台中市國光路 250 號

² 國立虎尾科技大學生物科技系 63208 雲林縣虎尾鎮文化路 64 號

摘要

王漿抗菌蛋白 (royalisin) 為蜜蜂工蜂下咽頭腺 (hypopharyngeal glands) 分泌的抗菌肽，其由 51 個胺基酸所組成，大小為 5.5 KDa，其中有 6 個半胱胺酸 (cysteine) 組成三個分子內的雙硫鍵，而雙硫鍵可以提供一個緊密、穩定的球狀結構，因此在低 pH 和高溫處理下都可以保持結構及活性穩定。王漿抗菌蛋白在低濃度下 (1 μ M) 具有抗菌殺菌的能力，主要可抗真菌、革蘭氏陽性菌及少數的革蘭氏陰性菌。在本研究中，將王漿抗菌蛋白成熟肽片融合至油體膜蛋白 C 端，中間以蛋白質剪接子 (intein) 連接構築成為融合蛋白質 (fusion protein) 基因，並藉由大腸桿菌 AD494 大量表現。將重組後的融合蛋白與三酸甘油脂、磷脂質混合後，重組產生人造油體 (artificial oil body, AOB)；藉由溫度轉換，讓中間連接的 intein 可以自發性的誘導斷裂，使 AOB 上的王漿抗菌蛋白被釋放至水層。所釋放出的王漿抗菌蛋白經蛋白質電泳膠位移分析發現它具有分子內雙硫鍵並正確折疊，且有抗菌活性，顯示本研究成功地利用人造油體蛋白質純化系統表達及純化具高抗菌活性的王漿抗菌蛋白。

關鍵詞：王漿抗菌蛋白、抗菌蛋白、蜂王漿、西洋蜂、人造油體。

前言

抗菌蛋白質 (antimicrobial peptide) 為先天免疫的一部分，廣泛存在於許多生物體

中，是一道天然的防禦系統 (Lai and Gallo, 2009)。當昆蟲受到微生物感染或其他外來物質侵入或受傷時，其體內脂肪體、血液等組織能形成特異的抗菌蛋白質，抵禦及抑制微生物

*論文聯繫人

Corresponding email: bocky@sunws.nfu.edu.tw

王漿抗菌蛋白之功能性表達 189

干擾，是一種十分有效防禦機制 (Bultet *et al.*, 1999)。防禦蛋白 (defensin) 是種富含雙硫鍵的帶正電抗菌胜肽，不僅能夠抵禦多種微生物的入侵，對於許多生物體來說，也是一道天然的防禦系統 (Raj and Dentino, 2002)。昆蟲內的防禦蛋白，多由 36~51 個胺基酸所組成，彼此都含有共同的結構特性，即藉由一個 alpha-helix 和兩個 antiparallel beta-strands 的結構所構成 (Klaudiny *et al.*, 2005)，並有三個分子內的雙硫鍵來穩定結構 (Hanzawa *et al.*, 1990; Bonmatin *et al.*, 1992; Cornet *et al.*, 1995)。這些抗菌胜肽具毒殺細菌、真菌、病毒以及抑制腫瘤等的能力，且不易產生抗藥性的優點，相信在未來，具有應用在醫療藥物上之潛力 (Hetru *et al.*, 1998; Yamauchi, 2001)。

王漿抗菌蛋白是從蜜蜂 (*Apis mellifera*) 蜂王漿中所發現的抗菌胜肽，主要是由蜜蜂工蜂的下咽喉腺 (hypopharyngeal glands) 所分泌，由 51 個胺基酸構成，其中含有 6 個半胱胺酸所組成的三個分子內的雙硫鍵，使其在強酸及高溫的環境下，也可以保持堅密的球狀來穩定結構 (Fujiwara *et al.*, 1990)。王漿抗菌蛋白已被證實可以抑制真菌以及革蘭氏陽性菌 (Bíliková *et al.*, 2001)，且在蜜蜂上主要作用為抵抗、殺死美洲幼蟲腐病的病原菌 (*Paenibacillus larvae larvae*) (Bíliková *et al.*, 2001; Bachanová *et al.*, 2002)。

目前能夠容易表達與純化大分子胜肽的重組蛋白質系統有很多，但能夠合成表達小分子胜肽的宿主卻很少，由於胜肽對於細胞內的蛋白質水解酶非常的敏感、萃取與純化的過程很複雜，以及大量表現含有抗菌活性的蛋白質後會對宿主產生毒性等問題，使得細胞外的天然抗菌蛋白質沒辦法順利的累積在細胞內，導致重組後蛋白質被表達的量很少，或者是大部

分被表達出的蛋白質會被水解掉 (Skosyrev *et al.*, 2003)。

人造油體蛋白質純化表達系統是一新穎的方法，可提供重組蛋白質的純化 (Peng *et al.*, 2004; Chiang *et al.*, 2005)。在這個系統中，利用一種位於種子油體膜上的構造蛋白質—油體膜蛋白 (oleosin)；以它當作攜帶者，將要表達的蛋白質與油體膜蛋白的 C 端或 N 端間接上蛋白質剪接子 intein 形成融合蛋白質，經由大腸桿菌大量表現後，再依植物油體的比例，將三種油體主要成份三酸甘油脂、融合蛋白質及磷脂質混合重組形成人造油體 (Chiang *et al.*, 2005)。由於油體膜蛋白的中間區疏水性非高，因而會嵌在油體上；因此，藉此特性在重組油體時，油體膜蛋白會嵌在油體並將位在攜帶子 N 或 C 端的目標蛋白質展現在油體表面。利用 intein 在 dithiothreitol (DTT) 或酸性環境下時發生自身誘導裂解，可以將與其相連的目標蛋白釋放出來，而油體膜蛋白質與 intein 仍結合在人造油體上。最後，再利用離心將人造油體與目標蛋白質分離，即可將水層液濃縮得到大量的目標蛋白 (Chiang *et al.*, 2005)。這個技術在蛋白質純化上提供了一個有效的與極具競爭力的方法，可用以取代傳統的親和性色層分析法。

本研究將王漿抗菌蛋白的基因從蜜蜂下咽喉腺的 cDNA 基因庫中以 PCR 增幅出來 (Klaudiny *et al.*, 2005)，並利用人造油體蛋白質純化表達系統來純化此一抗菌胜肽。我們藉由大腸桿菌 AD494 菌株 (DE3) 大量表現融合蛋白，由於大腸桿菌表達菌株 AD494 (DE3) 缺乏還原雙硫鍵的基因 (trxB2)，使得表達重組後的 royalisin 之分子內雙硫鍵可以在細胞質中保留並折疊成正確構型 (Derman *et al.*, 1993)。純化蛋白質經由最低抑菌濃度

(minimum inhibitory concentration, MIC) 與最低殺菌濃度測試 (minimum inhibitory bactericidal concentration, MBC), 發現經此蛋白質純化系統所純化出來的王漿抗菌蛋白對許多致病菌具有抗菌的效果。

材料與方法

一、收集工蜂的下咽頭腺

由苗栗農改場協助收集不同日齡的工蜂成蟲，並分別從工蜂中取出其下咽頭腺並置於 pH 7.4 的磷酸鈉緩衝液中，之後快速以液態氮冷凍並保存在 -20°C 中。

二、分離出 RNA 和構築蜜蜂下咽頭腺的 cDNA 基因庫

將不同發育時期的工蜂成蟲，於磷酸鈉緩衝液中解剖頭部取出下咽頭腺，立即以 TRIAGENT[®] 抽取總量 RNA (total RNA)，再以 SMART cDNA Library Construction kit (SMART[™] cDNA library construction kit, Cat. no. 634901, Clontech, Mountain View, CA) 構築此腺體於不同發育時期專屬的 cDNA 基因庫。

三、建構 royalisin 表現載體

根據 Klaudiny (2005) 解出的 royalisin 基因序列中，設計一組專一引子：上游引子 I1-mROY-f 5'ATGCTCTTCCAACGTAAC TGTGACCTTCTTCTCATTC3' (底標線為 *Sap* I 之切位) 及下游引子 I1-mROY-r 5'ATGAATTCTTAGAAACGTTTGTCCCA GAGAGATCTTT3' (底標線為 *Eco* RI 之切位) 利用 PCR 從工蜂下咽頭腺的 cDNA 基因庫中增幅抗菌蛋白的成熟肽段基因，並以 *Sap* I 及 *Eco* RI 切位將 cDNA 構築到質體

pOSP1 (Chiang *et al.*, 2005) 上，形成 pOSP1-roy，再將此質體轉型至含有 DE3 系統的大腸桿菌 AD494 (Novagene, Madison, WI) 中 (Sambrook *et al.*, 2001)，培養在含有 ampicillin (100 µg/mL) 的 LB 中去做篩選 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)。

四、大量表現 oleosin-intein 1-royalisin 融合蛋白

將重組質體 pOSP1-roy 轉型至大腸桿菌 AD494 (DE3) 中，當細菌生長至吸收光譜 OD₆₀₀ 為 0.6 時加入最終濃度為 0.1 mM 的 IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) 誘導大腸桿菌大量表現融合蛋白質 oleosin-intein-royalisin。誘導反應 3 個小時後，利用離心收集菌體並以緩衝溶液回溶，之後再用超音波振盪法將菌體打破，經由高速離心，分離沉澱物與上清液，利用 SDS-PAGE，進行電泳分析。

五、人造油體的構築與回收王漿抗菌蛋白

根據植物油體的標準比例，將收集的融合蛋白質與三酸甘油酯及磷脂質混合，利用超音波振盪重組人造油體，經由離心收集人造油體，之後再回溶於磷酸鈉緩衝溶液 (0.1 M, pH 7.4) 中，以低溫 4°C 處理 16 小時誘導剪切子 intein 1 裂解。最後利用高速離心，將含有目標蛋白質的水層回收，並且利用 SDS-PAGE 進行電泳分析。

六、抗菌活性測試

將 100 µl 的菌液 (最終濃度為 1-5 × 10⁴ CFU/ml)、100 µl 培養基 (TSB) 以及不同濃度的王漿抗菌蛋白液 100 µl 混合一起並培養於 96 孔盤中。利用光譜吸收儀偵測在波

長 600 nm 下的吸收值，測量細菌生長的濁度觀察細菌生長狀況。當最低濃度試驗組與對照組（沒有添加菌液）所測量獲得的吸光值接近，即為蛋白質之最低抑菌濃度（MIC）。從具 MIC 試驗結果的實驗組中分別取出 20 μ l 塗到 TSA 培養基中觀察細菌存活率，如果殺掉 99.99% 的菌數，使培養基上並沒有任何微生物的生長，所需要的最低濃度即為 MBC (Cole *et al.*, 1997)，以上試驗均以三次重複測試 (Altman *et al.*, 2006)。

七、Time-kill curve 測定

存活率試驗，經由 MBC 和 MIC 測試結果，選擇 8 種致病菌來測試王漿抗菌蛋白的殺菌能力，每種測試菌起始濃度均為菌數 10^6 CFU/ml，分別以不同王漿抗菌蛋白質濃度處理（革蘭氏陽性菌為 25 μ g/ml、革蘭氏陰性菌則為 15 μ g/ml），並以每一小時（0~16h）分別取出作用液，塗在 TSA 培養基上，置於 37°C 培養箱下培養觀察在不同反應時間下存活菌數 (Sambir *et al.*, 2002)。

結 果

一、利用大腸桿菌菌株 AD494 大量表達重組後的融合蛋白

將經由 PCR 所得到的王漿抗菌蛋白基因片段構築到人造油體蛋白質表達與純化系統的質體 pOSP1，將王漿抗菌蛋白融合到由體膜蛋白質的 C 端，中間用蛋白質剪切子 intein S 作為連接，並利用不還原雙硫鍵的大腸桿菌菌株 AD494 大量表現融合蛋白。在 37°C 下，用 IPTG 去誘導，利用 SDS-PAGE 分析誘導和未誘導下，融合蛋白質的表現量差異，結果發現經由誘導反應，在 37 kDa 大小處有大量融合蛋白表現（圖一）。誘導表現後的

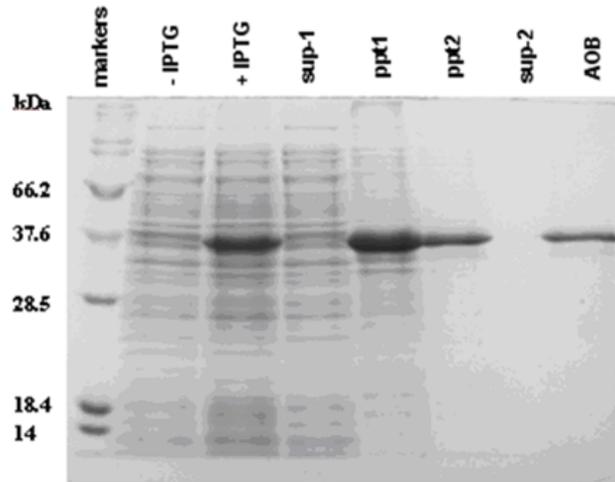
oleosin-intein S-royalisin 融合蛋白經由離心後，以非水溶的形式存在（圖一，ppt 1）。沉澱物經由緩衝清洗液（wash buffer）去除掉一些雜蛋白，經由離心得到上清液（圖一，sup-2）和沉澱物（圖一，ppt 2）；經此處理，大部分菌體內的蛋白質都會被去除掉，經由去除雜蛋白所得到的沉澱物（ppt 2）則用以架構成 AOB。

二、王漿抗菌蛋白的純化

由於王漿抗菌蛋白構築在 intein S 的 C 端，將構築的人造油體藉由室溫轉換到 4°C 下誘導 intein S 裂解，將王漿抗菌蛋白分離釋放，而油體膜蛋白質與 intein S 仍結合在人造油體上。再利用離心將人造油體與王漿抗菌蛋白分離，即可純化得王漿抗菌蛋白於上清液中。經 Tricine SDS-PAGE 分析，觀察到在上清中的 5 kDa 大小處，確實有王漿抗菌蛋白的存在（圖二，sup-3）。接著更進一步分析王漿抗菌蛋白分子間雙硫鍵在還原與非還原狀態下的呈現，如圖二結果所示，重組後的王漿抗菌蛋白在以含有 β -mercaptoethanol 的還原劑與沒有還原劑比較下，有一個明顯電泳移動的差異（圖二），並更進一步以 N 端定序確認王漿抗菌蛋白的組成（結果未顯示）(Mission Biotech, Taipei, Taiwan)。王漿抗菌蛋白質的生產回收效率為 0.5 mg/L 培養菌液。

三、經人造油體蛋白質純化系統純化的王漿抗菌蛋白的抗菌活性測試

針對 11 種選自蜜蜂或動物常見的革蘭氏陽性菌與陰性菌病原菌，利用純化的王漿抗菌蛋白來分析其殺菌或抑菌效果的結果顯示，純化的王漿抗菌蛋白對於大部分的革蘭氏陽性菌與一些革蘭氏陰性菌有抗菌的效果（表



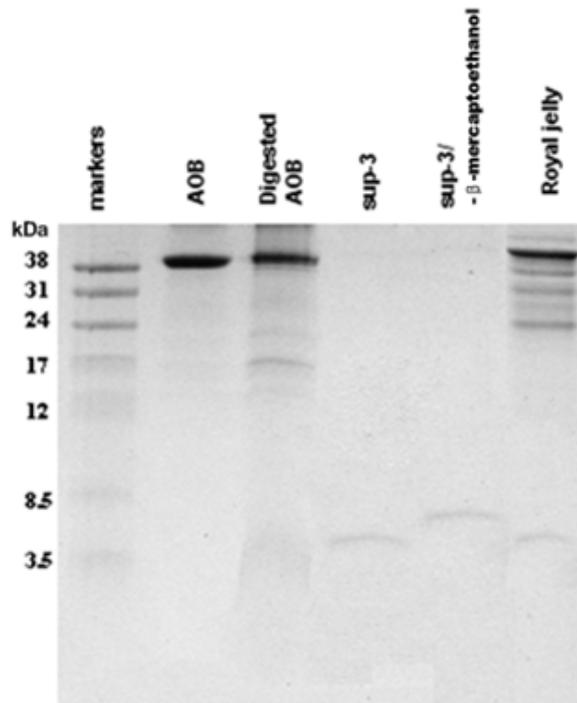
圖一 用 SDS-PAGE 分析大腸桿菌中大量表現出的 oleosin-intein S-royalisin。分別用 IPTG 或無 IPTG 處理下，打破大腸桿菌，將所有的蛋白質萃取出來，拿去離心可以得到上清液 (sup-1) 與沉澱物 (ppt 1)。ppt 1 經由 wash buffer 去除掉大部分雜蛋白，經由離心後，再收集沉澱物 (ppt 2)。並利用 ppt 2 來重組人造油體經由離心收集得到 (AOB)。

Fig. 1. SDS-PAGE analysis of oleosin-intein S-royalisin overexpressed in *E. coli*. With or without IPTG induction, total proteins of *E. coli* containing oleosin-intein S-royalisin were extracted, and then fractioned into supernatant (sup-1) and precipitate (ppt-1). The ppt-1 was washed by wash buffer and collected by centrifugation. AOBs were constituted with the pellet fraction (ppt-2) of the *E. coli* cell lysate containing oleosin-intein S-royalisin. After constitution, AOBs were recovered from the top, and the remaining supernatant (sup-2) was collected by centrifugation.

一)。在 MBC 試驗中，發現在 15 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下，可以殺死美洲幼蟲腐疾病的病原菌 *Paenibacillus larvae larvae*。明顯地，*Staphylococcus aureus* 對於王漿抗菌蛋白是非常敏感的，而 *Citrobacter koseri*、*Klebsiella pneumoniae*、*Escherichia coli* (Hemolytic) 對於王漿抗菌蛋白是具有抗性的。結果顯示，相較於革蘭氏陰性菌，王漿抗菌蛋白對於革蘭氏陽性菌有較佳的抗菌效果 (表一)。一般而言，最低抑菌所需的濃度 (MIC) 往往會低於最低殺菌所需的濃度 (MBC)。

根據 MBC 的結果，分別對革蘭氏陽性菌的 *Staphylococcus intermedius*、*B*、*Streptococcus alactolyticus*、*Staphylococcus*

aureus、*Staphylococcus xylosus*、*Paenibacillus larvae larvae* (圖三) 與革蘭氏陰性菌 *Vibrio parahaemolyticus*、CCRC.10806、*Salmonella choleraesuis*、*Pseudomonas aeruginosa* (圖四) 進行殺菌效率試驗。分別以 25 $\mu\text{g/ml}$ 的王漿抗菌蛋白處理革蘭氏陽性菌與 15 $\mu\text{g/ml}$ 的王漿抗菌蛋白處理革蘭氏陰性菌，並在不同時間點檢測細菌存活率，發現殺菌效果與時間有很大關係，將細菌與王漿抗菌蛋白處理的越久，殺菌的效果似乎更強，其中對革蘭氏陽性細菌的殺菌效率比對革蘭氏陰性菌的殺菌效率要好。



圖二 用 tricine-SDS-PAGE 去分析從 AOB 上純化到的王漿抗菌蛋白。藉著把溫度由 25°C 轉換到 4°C，使得 intein 自發性的誘導斷裂，讓 royalisin 從 AOB 上釋放出來。經由離心，將油層 (反應處理過 AOB) 與水層 (sup-3) 分開。為了確定是否雙硫鍵被原還，將純化到的蛋白質 (sup-3) 分別處理 β -mercaptoethanol 與不處理 β -mercaptoethanol 下是否有差異。最右邊的為在天然蜂王漿中的王漿抗菌蛋白，分子量約為 5 kDa。

Fig. 2. Tricine SDS-PAGE analysis of royalisin purified from AOBs. AOBs constituted with oleosin-intein S-royalisin were induced for self-splicing of the intein linker by reducing the temperature from 25 to 4°C, and then fractioned into the oil body layer (digest AOB) and supernatant (sup-3) by centrifugation. To check whether the disulfide was reduced or not, the sup-3 was resolved in tricine SDS-PAGE without the reducing agent, β -mercaptorthanol (sup-3/ β -mercaptorthanol). Native royalisin from Royal jelly was shown as 5 kDa.

討 論

王漿抗菌蛋白是屬於昆蟲防禦蛋白的一種，其分子特色為含有六個半胱胺酸所組成的三個雙硫鍵 (Hetru *et al.*, 1998)。所有昆蟲的防禦蛋白，包括王漿抗菌蛋白，都有相同的 cystein 組合，cys1-cys4、cys2-cys5、cys3-cys6 (Bultet *et al.*, 1999)。防禦蛋白主要是藉由結合到微生物的細胞膜上，並鑲入細胞膜形

成孔洞，造成細胞滲透壓失調，胞內物質大量外漏，最後導致標的生物死亡 (Cociancich *et al.*, 1993)。在本研究中發現，重組王漿抗菌蛋白對於大部分的革蘭氏陽性細菌有很高的活性，僅對於少部分的革蘭氏陰性菌有活性 (表一)；另外，對於會造成蜜蜂美洲幼蟲腐病的病原菌 *P. larvae larvae* 也有相當高的活性 (Bíliková *et al.*, 2001, Bachanová *et al.*, 2002)。王漿抗菌蛋白為小分子的胜肽卻有相

表一 純化的王漿抗菌蛋白對十一種動物及人類病原細菌的抗菌與殺菌分析

Table 1. Bacteriostatic and bactericidal activity of royalisin against 11 different animal and human-specific pathogens

| Bacteria | MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | MBC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Gram positive | | |
| <i>Staphylococcus intermedius</i> B | 14 | 15 |
| <i>Staphylococcus xylosus</i> | 12 | 25 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 0.8 | 5 |
| <i>Streptococcus alactolyticus</i> | 3.75 | 25 |
| <i>Paenibacillus larvae larvae</i> | — ^a | 15 |
| Gram negative | | |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 3 | 15 |
| <i>Salmonella choleraesuis</i> | 6 | 15 |
| <i>Citrobacter koseri</i> | NI ^b | NB ^c |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | NI | NB |
| <i>hemolytic Escherichia coli</i> | NI | NB |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 11 | 15 |

^a Non Detect

^b No inhibition activity

^c No bactericidal activity

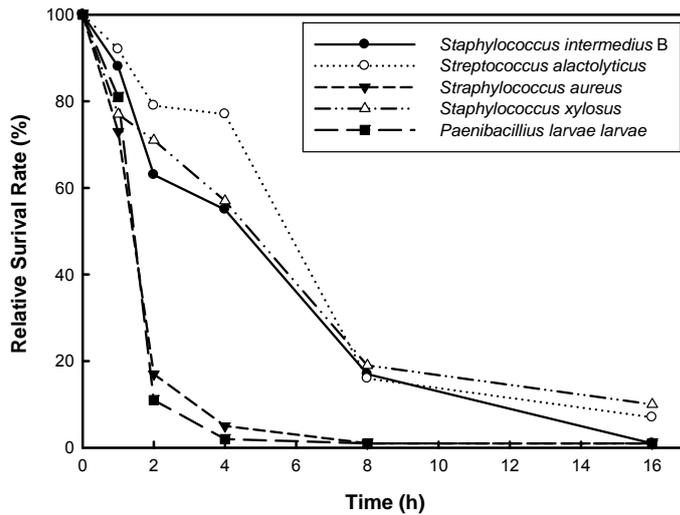
當強的抗菌活性，對於蜜蜂的飼養上將有很大的幫助，並也可能應用到人類醫療上。

利用大腸桿菌表達純化王漿抗菌蛋白時，因為王漿抗菌蛋白為部分的融合蛋白質，因此不會產生任何的抗菌活性，此融合蛋白質也不會影響細菌生長的速率，此一新發展出的融合技術，在對於有毒肽非常敏感的原核細胞中都可以被表現出來。在本研究中，之所以用人造油體蛋白質表現與純化系統取代昂貴的親和性管柱系統，是因為此系統的成本低且純化效率佳 (Peng *et al.*, 2004)。許多水溶性蛋白質在大腸桿菌中被表現後，會變成不水溶的內涵體；儘管如此，人造油體蛋白質純化系統，仍然展現出不錯的恢復功能的能力。結果顯示，王漿抗菌蛋白在折疊時會和非常疏水的油體膜蛋白質糾纏在一起，導致無法釋放出活性。在人造油體蛋白質純化系統中，藉疏水性作用力，因油體膜蛋白質疏水性區域會插入三酸甘油脂中，使油體膜蛋白質與王漿抗菌蛋白分開並能立即產生正確的自發性折疊，且保有

三組非還原的雙硫鍵 (圖二)。

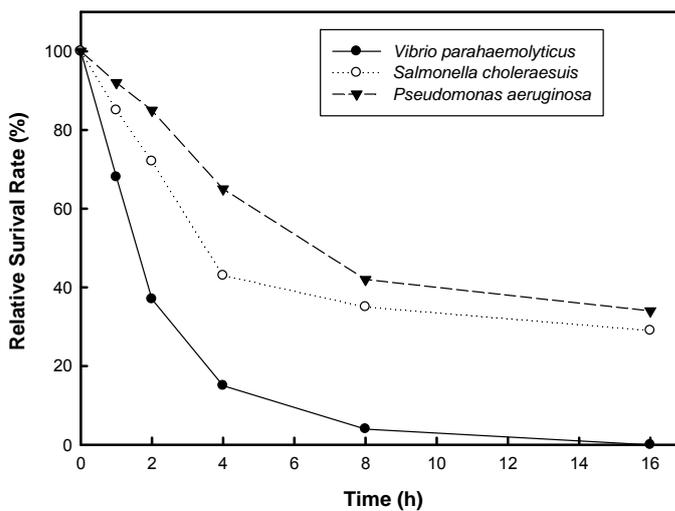
雙硫鍵在許多蛋白質的折疊、結構與功能上扮演一個很重要的角色。正常情況下，在大腸桿菌中的還原酶使半胱胺酸保持還原狀態，減少了雙硫鍵的形成；因此，在大腸桿菌裡，要產生需要雙硫鍵橋樑來提供穩定的蛋白質是很困難的 (Kadokura *et al.*, 2003)。在本研究中，大腸桿菌 AD494 由於其 glutaredoxin reductase 和 thioredoxin reductase ($\Delta\text{gor } \Delta\text{trxB}$) 的功能是被剔除的，所以在細胞質內可以形成分子內的雙硫鍵 (Kadokura *et al.*, 2003)。

先前研究中，大部分的抗菌蛋白質是用 GST-融合蛋白質系統去大量表現，並且用昂貴的親和性管柱去純化 (Skosyrev *et al.*, 2003)。在本研究中，王漿抗菌蛋白在大腸桿菌 AD494 (DE3) 中以 oleosin-intein S-royalisin 融合蛋白表現以及維持三個分子內雙硫鍵的形成，之後再和植物油混合形成 AOB。可以藉由溫度的轉換使 intein S 產生



圖三 革蘭氏陽性菌存活率試驗。以 25 µg/ml 濃度的王漿抗菌蛋白處理，分別觀察在不同時間內對 5 種革蘭氏陽性菌的殺菌效果。圖中不同的菌種用不同的符號標示。

Fig. 3. Time-killing curve of royalisin assayed on 5 Gram-positive bacterial strains. Bacteria were incubating with 25 µg/mL of the recombinant royalisin for different time periods and survival rates of bacteria were counted. The bacterial strains are marked with different symbols shown as in the figure.



圖四 革蘭氏陰性菌存活率試驗。以 15 µg/ml 濃度的王漿抗菌蛋白處理，分別觀察在不同時間內對三種革蘭氏陰性菌的殺菌效果。圖中不同的菌種用不同的符號標示。

Fig. 4. Time-killing curve of royalisin assayed on 3 Gram-negative bacterial strains. Bacteria were incubated with 15 µg/mL of the recombinant royalisin for different time periods and survival rates of bacteria were counted. The bacterial strains are marked with different symbols shown as in the figure.

自發性誘導斷裂讓王漿抗菌蛋白從 AOB 上被釋放出來，經由離心後收集上清液即可以得到王漿抗菌蛋白。王漿抗菌蛋白可以展現出非常好的活性，可能是折疊成正確的結構並且固定在油體表面上，王漿抗菌蛋白再藉由 intein S 的自發性裂解與油體分離。最後，這個技術對於重組小分子胜肽有很大的幫助，特別是含有那些需要把雙硫鍵正確折疊的結構。

引用文獻

- Altman, H., D. Steinberg, Y. Porat, A. Mor, D. Fridman, M. Fridman, and G. Bachrach.** 2006. In vitro assessment of antimicrobial peptides as potential agents against several oral bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 58: 198-201.
- Bachanová, K., J. Klauđiný, J. Kopernický, and J. Šimúth.** 2002. Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae larvae* through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie* 33: 259-269.
- Bíliková, K., W. Gusui, and J. Šimúth.** 2001. Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor. *Apidologie* 32: 275-283.
- Bonmatin, J. M., J. L. Bonnat, X. Gallet, F. Vovelle, M. Ptak, J. M. Reichart, J. A. Hoffmann, E. Keppi, M. Legrain, and T. Achstetter.** 1992. Two-dimensional ¹H NMR study of recombinant insect defensin A in water resonance assignments, secondary structure and global folding. *J. Biomol. NMR* 2: 235-256.
- Bultet, P., C. Hetru, J. L. Dimarcq, and D. Hoffmann.** 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 329-344.
- Cociancich, S., A. Ghazi, C. Hetru, J. A. Hoffmann, and L. Letellier.** 1993. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* 268: 19239-19245.
- Cole, A. M., P. Weis, and G. Diamond.** 1997. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J. Biol. Chem.* 272: 12008-12013.
- Cornet, B., J. M. Bonmatin, C. Hetru, J. A. Hoffmann, M. Ptak, and F. Vovelle.** 1995. Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure* 3: 435-448.
- Chiang C. J., H. C. Chen, Y. P. Chao, and J. T. C. Tzen.** 2005. Efficient system of artificial oil bodies for functional expression and purification of recombinant nattokinase in *Escherichia coli*. *J. Agri. Food Chem.* 53: 4799-4804.
- Derman, A. I., W. A. Prinz, D. Belin, and J. Beckwith.** 1993. Mutation that allows disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* 262: 1744-1747.
- Fujiwara, S., J. Imai, M. Fujiwara, T.**

- Yaeshima, T. Kawashima, and K. Kobayashi.** 1990. A potent antibacterial protein in royal jelly. *J. Biol. Chem.* 265: 11333-11337.
- Hanazawa, H., I. Shimsda, T. Kuzuhara, H. Komano, D. Kohda, F. Inagaki, S. Natori, and Y. Arata.** 1990. ¹H nuclear magnetic resonance study of the solution conformation of an antibacterial protein, sapecin. *FEBS Lett.* 269: 413-420.
- Hetru, C., D. Hoffmann, and P. Bulet.** 1998. Antimicrobial peptides from insects. pp. 40-66. *In: P. T. Brey, and D. Hultmark, eds. Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects.* Chapman & Hall, London.
- Kadokura H, F. Katzen, and J. Beckwith.** 2003. Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 111-135.
- Klaudiny, J., S. Albert, K. Bachanová, J. Kopernicky, and J. Šimúth.** 2005. Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 11-22.
- Lai, Y., and R. L. Gallo.** 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 30: 131-141.
- Peng, C. C., J. C. F. Chen, D. J. H. Shyu, M. J. Chen, and J. T. C. Tzen.** 2004. A system for purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* via artificial oil bodies constituted with their oleosin-fused polypeptides. *J. Biotechnol.* 111: 51-57.
- Raj, P. A., and A. R. Dentino.** 2002. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol. Lett.* 206: 9-18.
- Sambir, V., A. Marangoni, L. Giacani, R. Gennaro, R. Murgia, R. Cevenini, and M. Cinco.** 2002. Comparative in vitro activity of five cathelicidin-derived synthetic peptides against *Leptospira*, *Borrelia* and *Treponema pallidum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 50: 895-902.
- Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Skosyrev, V. S., E. A. Kuleskiy, A. V. Yakhnin, Y. V. Temirov, and L. M. Vinokurov.** 2003. Expression of the recombinant antibacterial peptide sarcotoxin IA in *Escherichia coli* cells. *Protein Expr. Purif.* 28: 350-356.
- Yamauchi, H.** 2001. Two novel insect defensins from larvae of the cupreous chafer, *Anomala cuprea*: purification, amino acid sequences and antibacterial activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 75-78.

收件日期：2009年8月14日

接受日期：2009年10月16日

Functional Expression and Purification of the Disulfide Bond-dependent Antimicrobial Peptide, Royalisin, via Artificial Oil Bodies

Jun-Ming Tseng¹, and Chi-Chung Peng^{2*}

¹ Institute of Biotechnology, National Chung-Hsing University, Taichung City 40227, Taiwan

² Department of Biotechnology, National Formosa University, No. 64, Wunhua Rd., Huwei Township, Yunlin County 63208, Taiwan

ABSTRACT

Royalisin is an antibacterial peptide previously isolated from the royal jelly of *Apis mellifera*. This peptide is toxic against a broad range of gram-positive bacteria, gram-negative bacteria and fungi. Royalisin contains 51 amino acid residues with 6 cysteine residues forming three intramolecular disulfide linkages, which may form a compact globular structure exhibiting high stability at low pH and high temperature. In this study, royalisin was overexpressed in *Escherichia coli* AD494 (DE3) as a recombinant protein fused with the C-terminus of oleosin by a linker polypeptide, intein *S*. Artificial oil bodies (AOBs) were reconstituted with triacylglycerol and phospholipid to obtain the insoluble recombinant protein. Royalisin was subsequently released from artificial oil bodies through self-splicing of intein induced by temperature alteration, and the recombinant royalisin was collected in the supernatant after centrifugation. Recombinant royalisin released from artificial oil bodies was folded to the optimal structure with its three intracellular disulfide bonds and exhibited high antibacterial activity. These results showed that the functional antibacterial peptide, royalisin, was successfully expressed and purified via the efficient AOB expression/purification system.

Key words: royalisin, antimicrobial peptides, royal jelly, *Apis mellifera*, AOB expression/purification system

* Corresponding email: bocky@sunws.nfu.edu.tw