

# 二硫键对 Enterocin A 抗李斯特菌 LIN 3 活性的影响

赵爱珍<sup>1</sup>, 徐兴然<sup>1</sup>, 韩文瑜<sup>2</sup>

(1. 西南大学药学院, 重庆 400715; 2. 吉林大学畜牧兽医学院, 吉林 长春 130062)

**摘要:** 依据 Enterocin A 的氨基酸序列, 设计半胱氨酸替换突变体 Enterocin A(C14S)和 Enterocin A(C47W), 通过大肠杆菌表达系统获得重组突变体。用还原剂  $\beta$ - 巯基乙醇处理 MBP-Enterocin A。采用琼脂扩散实验检测重组 Enterocin A、突变体及还原产物的抗无害李斯特菌 LIN3 活性。结果表明: N 末端融合部分不含有半胱氨酸的 MBP-Enterocin A 或 His tag-Enterocin A 均表现强抗菌活性; 而 N 末端融合部分含有半胱氨酸的 GST-Enterocin A, 表现很弱的抗菌活性; 半胱氨酸替换突变体及 MBP-Enterocin A 还原产物均不显示抗菌活性。实验结果证明二硫键为 Enterocin A 活性的重要影响因素。

**关键词:** Enterocin A; 二硫键; 抗李斯特菌活性

## Effect of Disulfide Bond on Anti-*Listeria innocua* LIN3 Activity of Enterocin A

ZHAO Ai-zhen<sup>1</sup>, XU Xing-ran<sup>1</sup>, HAN Wen-yu<sup>2</sup>

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

**Abstract:** Based on the amino acid sequence of Enterocin A, two cysteine substitution mutants, Enterocin A (C14S) and Enterocin A (C47W) were designed and obtained in *E. coli* expression systems. The agar diffusion assay was used to test the anti-*Listeria innocua* LIN3 activity of the mutants, recombinant Enterocin A and  $\beta$ -mercaptoethanol-reduced recombinant Enterocin A. Recombinant Enterocin A with His-tag at N-terminus revealed stronger antibacterial activity, while GST-Enterocin A revealed a significant decrease in antibacterial activity. The two mutants and  $\beta$ -mercaptoethanol-reduced recombinant Enterocin A with destroyed disulfide bonds exhibit no detectable antibacterial activity. Therefore, disulfide bonds are essential for the antibacterial activity of Enterocin A.

**Key words:** Enterocin A; disulfide bond; anti-*Listeria* activity

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)15-0182-04

乳酸菌细菌素是由乳酸菌产生的具有抗菌活性的多肽或者蛋白质的统称, 其中 II a 亚类乳酸菌细菌素属于多肽家族, 由于具有抗食源性病原菌——单核细胞增生李斯特菌及一些乳酸菌的活性而备受食品界关注<sup>[1-2]</sup>。II a 亚类细菌素由 36~48 个氨基酸组成, 可以分为亲水性的 N 端结构区和两亲性/疏水性的 C 端结构区<sup>[2-3]</sup>; 含有 2 个或者 4 个半胱氨酸, 可以形成 1 个 N 端区二硫键和 / 或 1 个 C 端区二硫键<sup>[4-6]</sup>。依据一级结构特点及作用模式, 该类细菌素与细胞膜作用的空间结构及膜定位被预测<sup>[7-8]</sup>。N 端区形成 S 形  $\beta$ - 折叠结构, 介导细菌素与细胞膜的吸附; C 端区的  $\alpha$ - 螺旋和延伸末端形成发夹样结

构, 插入细胞膜的疏水区, 形成跨膜螺旋结构, 介导靶细胞内容物的泄漏<sup>[7-10]</sup>。

Enterocin A 由 47 个氨基酸组成, 第 1 至 19 位为 N 端区, 第 20 至 47 位氨基酸为 C 端区<sup>[3,11]</sup>; 所含有的 4 个半胱氨酸可以形成 2 个二硫键 C14-C19 和 C29-C47, 分别起到稳定  $\beta$ - 折叠结构和发夹结构的作用<sup>[5-6,12]</sup>。本实验通过对重组 Enterocin A、半胱氨酸替换突变体及 MBP-Enterocin A 还原产物的抗无害李斯特菌 LIN3 活性进行比较, 以证明二硫键为 Enterocin A 具有抗菌活性的重要因素, 这对于其分子设计具有指导意义, 从而筛选出稳定性高、抗菌活性强的突变体。

收稿日期: 2010-11-09

作者简介: 赵爱珍(1972—), 女, 副教授, 博士, 主要从事乳酸菌细菌素的抗菌活性研究。

E-mail: zaoaizhen@yahoo.com.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

重组 Enterocin A 工程菌: 表达 MBP- Enterocin A 的大肠杆菌 DH5 $\alpha$ /pMA<sup>[13]</sup>、表达 GST- Enterocin A 的大肠杆菌 DH5 $\alpha$ /pXA<sup>[14]</sup>、表达 His tag-Enterocin A 的大肠杆菌 BL21(DE3)/pTA<sup>[15]</sup> 由西南大学药学院生物药学教研室保存。

宿主菌为大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、指示菌为无害李斯特菌 LIN3, 由西南大学药学院生物药学教研室保存。

### 1.2 试剂

Pfu DNA 聚合酶 加拿大 BBI 公司; 限制性内切酶 *Xmn* I 和 *Hind* III 美国 New England Biolabs 公司; T4 DNA 连接酶、异丙基- $\beta$ -D- 硫代半乳糖苷(IPTG) 美国 Promega 公司; 蛋白质分子质量标准 美国 Fermentas 公司。

### 1.3 仪器与设备

HH-6 型数控恒温水浴锅 常州国华电器有限公司; DHP-9052 型电热恒温培养箱 上海齐欣科学仪器有限公司; JY92- II 型超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物科技股份有限公司; DYY-6C 型电泳仪 北京市六一仪器厂。

### 1.4 半胱氨酸替换突变体的分子设计

依据 Enterocin A 的氨基酸序列, 本实验将其第 14 位和 47 位的半胱氨酸分别替换为极性氨基酸丝氨酸(S)和疏水性氨基酸色氨酸(W), 所获得的 2 个突变体的氨基酸序列如下:

Enterocin A(C14S): TTHSGKYYGNGVY[S]TKNKCTVDWAKATTCTIAGMSIGGFLGGAIPGK[C];

Enterocin A(C47W): TTHSGKYYGNGVY[C]TKNKCTVDWAKATTCTIAGMSIGGFLGGAIPGK[W]。

### 1.5 重组突变体的获得

依据拟获得的突变体 Enterocin A(C14S) 和 Enterocin A(C47W) 的氨基酸序列分别设计引物对 FAC14S: RAC14S 和 FA C47W: RA C47W。参照 MBP-Enterocin A 的表达策略进行突变体基因的 PCR 扩增、重组表达质粒的构建及表达, 并进行目的蛋白的 SDS-PAGE 分析<sup>[14]</sup>。引物序列为:

FAC14S: 5'-ACCACTCATAGTGGAAAATATTATGGAAATGGAGTGTATAGT-3'; RAC14S: 5'-GCGAAGCTTTTAGCACTTCCCTG-3'; FAC47W: 5'-ACCACTCATAGTGGAAAATATTATGG-3'; RAC47W: 5'-GCGAAGCTTTTACCACCTCCCTG-3'。

### 1.6 样品的制备

分别对 3 种重组 Enterocin A 工程菌和 2 种 MBP-Enterocin A 突变体工程菌进行增菌培养, 然后加入 IPTG 诱导, 离心收集菌体, TE 缓冲液悬浮后于冰水浴中超声破碎细胞。

超声参数: 超声时间 3s, 间隔时间 6s, 全程时间 10min, 功率 350W。将裂解液于 4℃、12000r/min 离心 10min, 收集上清液即为重组 Enterocin A 和 MBP-Enterocin A 突变体的粗制品。按照 MBP 融合蛋白纯化系统操作手册制备 MBP-Enterocin A 纯化样品。

### 1.7 $\beta$ - 巯基乙醇处理 MBP-Enterocin A

将 MBP-Enterocin A 纯化样品分为两份: 一份加入  $\beta$ - 巯基乙醇至终浓度为 50mmol/L, 另一份不加  $\beta$ - 巯基乙醇, 37℃ 水浴 1h。

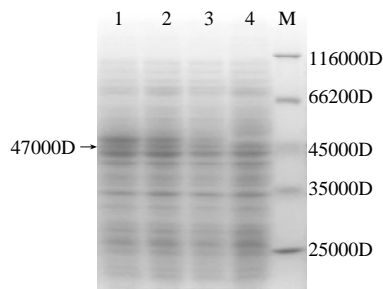
### 1.8 抗无害李斯特菌 LIN3 活性检测

将无害李斯特菌 LIN3 培养物涂布于琼脂平板表面, 打孔。将 50 $\mu$ L 样品(包括 3 种重组 Enterocin A 粗制品、2 种 MBP-Enterocin A 突变体粗制品、 $\beta$ - 巯基乙醇处理或者未处理的 MBP-Enterocin A 纯化样品)加入到琼脂孔中, 4℃ 放置 2~4h 进行扩散, 然后于 35℃ 培养 14h, 能够产生明显抑菌圈的样品即判定为阳性。

## 2 结果与分析

### 2.1 突变体的获得

目的基因的测序结果证实重组表达质粒 pMA(C14W)、pMA(C47W) 的正确构建。SDS-PAGE 分析结果表明: 工程菌 DH5 $\alpha$ /pMA(C14S)、DH5 $\alpha$ /pMA(C47W) 在 IPTG 诱导下能够表达与预计分子质量大小一致的融合蛋白(约 47000D), 结果见图 1。



1. 诱导的 DH5 $\alpha$ /pMA(C14S) 总细胞组分; 2. 诱导的 DH5 $\alpha$ /pMA(C47W) 总细胞组分; 3. 未诱导的 DH5 $\alpha$ /pMA(C14S) 总细胞组分; 4. 未诱导的 DH5 $\alpha$ /pMA(C47W) 总细胞组分; M. 分子质量标准。

图 1 MBP-Enterocin A 突变体的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of MBP-Enterocin A mutants

### 2.2 重组 Enterocin A 的氨基酸序列对比

前期研究已经利用大肠杆菌表达系统表达了 3 种重组 Enterocin A, 包括 2 种融合蛋白和 1 种融合多肽, 并推导出它们的氨基酸序列<sup>[13-15]</sup>。

MBP-Enterocin A 的氨基酸序列如下(下划线部分为 Enterocin A 的氨基酸序列):

MKIKTGARILALSALTMMFASALAKIEEGKLVIV  
INGDKGYNGLAIEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVA

ATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYP  
FTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSIIYNKDLLPNPPKTWEE  
IPALDKELKAKGKSALMFLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENG  
KYDIKDVGVNDAGAKAGLTLVLDLIKHKHMNADTDYSIAEAA  
FNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKP  
FVGVL SAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLG  
AVALKSYYEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFW  
YAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSNNNNNNNN  
NNLGIEGRTTTHSGKYYNGVYCTKNKCTVDWAKATTCTIAGMSIGGFLGGAIPGKCT。

GST-Enterocin A 的氨基酸序列如下(下划线部分为 Enterocin A 的氨基酸序列):

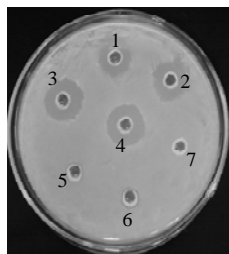
MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGD  
KWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVLTQSMARIYADKHN  
LGGCTPKERAELSMLEGAFLDIRYGVSRISYKDFETLKVD  
FLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDA  
LDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSK  
YIAWPLQGWQATFGGGDHPKSDLEGRGIHTTTTHSGKYYNGVYCTKNKCTVDWAKATTCTIAGMSIGGFLGGAIPGKCT。

His tag-Enterocin A 的氨基酸序列如下(下划线部分为 Enterocin A 的氨基酸序列):

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGS  
TTTHSGKYYNGVYCTKNKCTVDWAKATTCTIAGMSIGGFLGGAIPGKCT。

在 MBP-Enterocin A 中, Enterocin A 的 N 端融合标签为麦芽糖结合蛋白(MBP), 由 412 个氨基酸组成, 不含有半胱氨酸。在 GST-Enterocin A 中, Enterocin A 的 N 端融合标签为谷胱甘肽-S-转移酶(GST), 由 228 个氨基酸组成, 含有 4 个半胱氨酸。在 His tag-Enterocin A 中, Enterocin A 的 N 端融合标签为含有多聚组氨酸的 34 氨基酸多肽, 不含有半胱氨酸。

### 2.3 重组 Enterocin A 的抗无害李斯特菌 LIN3 活性比较



1、2. His tag-Enterocin A; 3、4. MBP-Enterocin A; 5、6. GST-Enterocin A; 7. 未加入样品。

图2 重组 Enterocin A 的抗无害李斯特菌 LIN3 活性

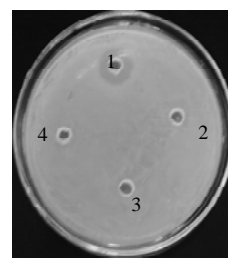
Fig.2 Anti-*Listeria innocua* LIN3 activity of recombinant Enterocin A

图2显示 MBP-Enterocin A 和 His tag-Enterocin A 具

有强抗菌活性, GST-Enterocin A 具有很弱的抗菌活性。MBP-Enterocin A 和 His tag-Enterocin A 具有强抗菌活性表明融合部分的分子质量大小对抗菌活性影响不大。在 MBP-Enterocin A 和 His tag-Enterocin A 中, Enterocin A 的 N 末端融合部分均不含有半胱氨酸, 不会干扰 Enterocin A 部分中两个有效二硫键的形成, 因此表现强抗菌活性。在 GST-Enterocin A 中, Enterocin A 的 N 末端融合部分含有 4 个半胱氨酸, 会与 Enterocin A 部分中的 4 个半胱氨酸反应形成无效二硫键而干扰 Enterocin A 部分中两个有效二硫键的形成, 因此表现很弱的抗菌活性。

### 2.4 MBP-Enterocin A 及突变体的抗无害李斯特菌 LIN3 活性比较

重组半胱氨酸替换突变体 MBP-Enterocin A(C14S)和 MBP-Enterocin A(C47W)均不表现抗菌活性, 结果见图3。替换氨基酸丝氨酸或色氨酸对 Enterocin A 部分的亲水性或者疏水性影响不大, 不会影响抗菌活性。由于 MBP 对 Enterocin A 的活性基本没有影响<sup>[13]</sup>, 所以重组突变体的特性基本代表了天然 Enterocin A 突变体的特性。Enterocin A 突变体含有 3 个半胱氨酸, 能形成 1 个有效二硫键和 2 个无效二硫键; Enterocin A (C14S)能形成有效二硫键 C29-C47, Enterocin A (C47W)能形成有效二硫键 C14-C19; 检测结果显示这 2 个突变体无抗菌活性, 进一步证明 N 端二硫键和 C 端二硫键通过稳定 Enterocin A 的空间结构而使其具有抗菌活性。细菌素 pediocin PA-1/AcH 含有 4 个半胱氨酸<sup>[16]</sup>, 目前所获得该细菌素的单个半胱氨酸替换突变体显示无抗菌活性或者活性减弱<sup>[17-18]</sup>。Sakacin P 含有 2 个半胱氨酸, 能够形成 1 个 N 端二硫键<sup>[19]</sup>, 而引入 1 个 C 端二硫键的突变体的抗菌谱拓宽且热稳定性提高<sup>[6]</sup>。

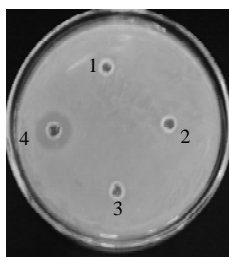


1. MBP-Enterocin A; 2. MBP-Enterocin A (C14S); 3. MBP-Enterocin A (C47W); 4. 未加入样品。

图3 MBP-Enterocin A 突变体的抗无害李斯特菌 LIN3 活性

Fig.3 Anti-*Listeria innocua* LIN3 activity of MBP-Enterocin A mutants

### 2.5 $\beta$ -巯基乙醇对 MBP-Enterocin A 抗无害李斯特菌 LIN3 活性的影响



1.MBP-Enterocin A; 2. MBP-Enterocin A  
还原产物; 3.缓冲液; 4.未加入样品。

图4 MBP-Enterocin A 还原产物的抗无害李斯特菌 LIN3 活性

Fig.4 Anti-*Listeria innocua* LIN3 activity of reduced MBP-Enterocin A

$\beta$ -巯基乙醇处理前后 MBP-Enterocin A 的抗菌活性结果如图 4 所示。 $\beta$ -巯基乙醇处理过的 MBP-Enterocin A 无抗菌活性。DTT、 $\beta$ -巯基乙醇等还原剂具有还原二硫键为半胱氨酸的能力。还原剂处理的 pediocin PA-1/AcH 表现弱抗菌活性<sup>[15,20]</sup>。前期研究<sup>[21]</sup>和本研究均表明  $\beta$ -巯基乙醇能够还原 Enterocin A 中的二硫键,使其丧失抗菌活性。

### 3 结 论

MBP-Enterocin A、GST-Enterocin A、His tag-Enterocin A 的抗无害李斯特菌 LIN3 活性均不依赖于 Enterocin A 的 N 末端融合部分的分子质量大小,而依赖于 N 末端融合部分是否含有半胱氨酸。融合部分不含有半胱氨酸的 MBP-Enterocin A 或 His tag-Enterocin A 表现强抗菌活性,而融合部分含有半胱氨酸的 GST-Enterocin A 表现很弱的抗菌活性,这是由于多余半胱氨酸会干扰 Enterocin A 部分中有效二硫键的形成所致。单个半胱氨酸替换突变体 Enterocin A(C14S)或 Enterocin A(C47W)含有 3 个半胱氨酸,缺乏形成 2 个二硫键的条件,仅能形成 1 个有效二硫键或其他无效二硫键;突变体均不具有抗菌活性,表明 N 端或者 C 端二硫键是 Enterocin A 具备抗菌活性的关键因素。MBP-Enterocin A 中的二硫键能够被  $\beta$ -巯基乙醇还原为半胱氨酸而丧失抗菌活性,也间接证明了二硫键的重要性。本研究证实二硫键为 Enterocin A 具有抗菌活性的重要影响因素,对于设计出稳定性高、抗菌活性强的突变体具有指导意义。

### 参考文献:

- [1] CINTAS L M, HERRANZ C, HERNANDEZ P E, et al. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria[J]. Food Science and Technology International, 2001, 7(4): 281-305.
- [2] DRIDER D, FIMLAND G, HÉCHARD Y, et al. The continuing story of class IIa bacteriocins[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2006, 70(2): 564-582.
- [3] FIMLAND G, BLINGSMO O R, SLETTEN K, et al. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various

- pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(9): 3313-3318.
- [4] KAUR K, ANDREW L C, WISHART D S, et al. Dynamic relationships among type IIa bacteriocins: temperature effects on antimicrobial activity and on structure of the C-terminal amphipathic alpha helix as a receptor-binding region[J]. Biochemistry, 2004, 43(28): 9009-9020.
- [5] EIJSINK V G, SKEIE M, MIDDELHOVEN P H, et al. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(9): 3275-3281.
- [6] FIMLAND G, JOHNSEN L, AXELSSON L, et al. A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum[J]. J Bacteriol, 2000, 182(9): 2643-2648.
- [7] UTENG M, HAUGE H H, MARKWICK P R L, et al. Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge[J]. Biochemistry, 2003, 42(39): 11417-11426.
- [8] JOHNSEN L, FIMLAND G, NISSEN-MEYER J. The C-terminal domain of pediocin-like antibacterial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal parts of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum cognate bacteriocins[J]. J Biol Chem, 2005, 280(10): 9243-9250.
- [9] HECHARD Y, SAHL H G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria[J]. Biochimie, 2002, 84(5/6): 545-557.
- [10] HAUGEN H S, FIMLAND G, NISSEN-MEYER J, et al. Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide curvacin A[J]. Biochemistry, 2005, 44: 16149-16157.
- [11] O'KEEFFE T, HILL C, ROSS R P. Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(4): 1506-1515.
- [12] FIMLAND G, JOHNSEN L, DALHUS B, et al. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action[J]. J Pept Sci, 2005, 11(11): 688-696.
- [13] 赵爱珍, 韩文瑜, 徐兴然. 融合蛋白 MBP-enterocin A 的表达、纯化及抗菌活性检测[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(11): 1446-1449.
- [14] 赵爱珍, 韩文瑜, 徐兴然, 等. Enterocin A 在大肠杆菌中的表达及活性检测[J]. 吉林农业大学学报, 2008, 30(1): 89-92.
- [15] 赵爱珍, 韩文瑜, 王金玲, 等. 肠球菌素 A 与 GST 的融合表达及抑菌活性检测[J]. 动物医学进展, 2006, 27(6): 75-78.
- [16] MARUGG J D, GONZÁLEZ C F, KUNKA B S, et al. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58(8): 2360-2367.
- [17] TOMINAGA T, HATAKEYAMA Y. Determination of essential and variable residues in pediocin PA-1 by NNK scanning[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(2): 1141-1147.
- [18] MILLER K W, SCHAMBER R, OSMANAGAOGLU O, et al. Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(6): 1997-2005.
- [19] TICHACZEK P S, VOGEL R F, HAMMES W P. Cloning and sequencing of *sakP* encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH673[J]. Microbiology, 1994, 140(2): 361-367.
- [20] RAY B, SCHAMBER R, MILLER K W. The pediocin AcH precursor is biologically active[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(6): 2281-2286.
- [21] 赵爱珍, 徐兴然, 韩文瑜. 外界因素对重组 Enterocin A 抗菌活性的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 327-320.