降糖多肽 Brevinin-2GUb 的高效表达及活性鉴定

林静莲，黄敏华，王蒙，马毅，王菊芳

（华南理工大学生物科学与工程学院，广东广州 510006）

摘要：为实现降糖多肽 Brevinin-2GUb 在大肠杆菌中的高效表达，本文将 Brevinin-2GUb 基因插入到含有硫氧还蛋白、His 标签及肠激酶酶切位点的 pET32a 载体中，将重组表达载体 pET32a-Trx-His-EK-Brevinin-2GUb 转化至大肠杆菌中诱导表达 Trx-His-EK-Brevinin-2GUb 融合蛋白。通过对表达温度进行优化，结果显示 16 ℃诱导表达 20 h 后融合蛋白产量达到 36 mg/L；该融合蛋白经肠激酶（EK）特异性切割后成功获得不带标签的 Brevinin-2GUb 多肽，产量约为 2.50 mg/L，纯度达 90%以上。通过反相高效液相色谱对重组表达的 Brevinin-2GUb 进行鉴定，结果显示重组表达的 Brevinin-2GUb 与人工合成的 Brevinin-2GUb 的氨基酸序列一致。通过血平板检测发现，170 μg/mL 的重组表达 Brevinin-2GUb 多肽无溶血效应。此外，重组表达的 Brevinin-2GUb 多肽在浓度为 10 μg/mL 时对 INS-1 细胞产生显著的刺激胰岛素分泌作用（为基础释放量的 120.04%；p<0.01）。研究结果为 Brevinin-2GUb 多肽开发为降糖口服液及多肽药物奠定了基础。

关键词：Brevinin-2GUb；大肠杆菌；高效表达；促胰岛素分泌活性

文章篇号：1673-9078(2020)05-155-162 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.5.021

High Expression and Activity Identification of the Hypoglycemic Peptide Brevinin-2GUb

LIN Jing-lian, HUANG Min-hua, WANG Meng, MA Yi, WANG Ju-fang

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In order to achieve high expression of the hypoglycemic peptide Brevinin-2GUb in *E. coli*, the Brevinin-2GUb gene was inserted into the pET32a vector containing thioredoxin, His tag and enterokinase cleavage site, and then the recombinant expression vector pET32a-Trx- His-EK-Brevinin-2GUb was obtained, which was transformed into *E. coli* for the fusion protein Trx-His-EK-Brevinin-2GUb expression. Through optimization of its expression temperature, results showed that the fusion protein had the highest yield with 36 mg/L after inducing at 16 ℃ for 20 hours. The Trx-His-EK-Brevinin-2GUb fusion protein was successfully cleaved by enterokinase (EK). The purified Brevinin-2GUb without any tag was obtained with a yield of approximate 2.50 mg/L and the purity ≥90%. The purified Brevinin-2GUb was identified by reversed phase high performance liquid chromatography. The results showed that the amino acid sequence of purified Brevinin-2GUb was consistent with the synthesized Brevinin-2GUb. The purified Brevinin-2GUb peptide had no hemolytic activity toward mammalian cells at the concentration of 170 μg/mL. In addition, purified Brevinin-2GUb produced a significant stimulation of insulin release (120.04% of basal rate; p<0.01) against INS-1 cell lines at a concentration of 10 μg/mL. The results can provide the foundation for the development of Brevinin-2GUb peptide as a hypoglycemic oral solution and a peptide drug.

Key words: Brevinin-2GUb; *Escherichia coli*; high expression; insulin-releasing activity

引文格式：

林静莲,黄敏华,王蒙,等.降糖多肽 Brevinin-2GUb 的高效表达及活性鉴定[J].现代食品科技,2020,36(5):155-162

LIN Jing-lian, HUANG Min-hua, WANG Meng, et al. High expression and activity identification of the hypoglycemic peptide Brevinin-2GUb [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 155-162

近几十年来，全球成年人糖尿病的患病率持续上升[1]，糖尿病已经成为全世界范围内最常见的慢性病之一[2]。根据国际糖尿病联合会（IDF）数据统计，2017年全球有4.51亿（18~99岁）糖尿病患者，预计到2045年，糖尿病患者数量将增至6.93亿[3]，其中80%~90%属于II型糖尿病。由于目前临床治疗II型糖尿病的药物如磺酰脲类、二甲双胍类和格列奈类等疗效有限，且会

收稿日期：2019-05-25

基金项目：科技部“863”科技计划项目（2014AA021004）

作者简介：林静莲（1993-），女，硕士研究生，研究方向：分子生物学

通讯作者：王菊芳（1973-），女，博士，教授，研究方向：发酵工程、蛋白质工程

出现耐受性和毒副作用，因此开发能够调节糖代谢并显著降低毒副作用的生物活性多肽用于治疗糖尿病成为国内外的研究热点。

降糖多肽Brevinin-2GUb是在2008年从亚洲青蛙*Hylarana guntheri*的皮肤分泌物中分离出来的具有抗菌活性和显著促胰岛素分泌活性的多肽[4]，有极大的研究价值。Brevinin-2GUb多肽属于Brevinin-2家族，由30个氨基酸所构成，为两亲性阳离子多肽，在C端有Brevinin家族典型的、由二硫键桥连接形成的环状七肽结构（“Rana box”）[5]。人工合成的Brevinin-2GUb在浓度为100 nM时对BRIN-BD11细胞的促胰岛素分泌量为基础释放量的148%，在浓度为3 μM时对BRIN-BD11细胞的促胰岛素分泌量为基础释放量的373%[4]。而Brevinin-1CBb在浓度为30 nM时对BRIN-BD11细胞的促胰岛素分泌量为基础释放量的119%[6]，Brevinin-2相关肽（B2RP）在浓度为1 μM时对BRIN-BD11细胞的促胰岛素分泌量为基础释放量的148%[7]。以上研究结果表明Brevinin-2GUb多肽比Brevinin-1CBb、Brevinin-2相关肽（B2RP）等Brevinin家族其他多肽具有更显著的促胰岛素分泌活性。此外，人工合成的Brevinin-2GUb能够显著促进正常大鼠的胰岛素分泌，但对体重、血糖没有显著影响；糖尿病大鼠组中，注射Brevinin-2GUb后，大鼠的体重显著上升、胰岛素水平均有明显升高，血糖明显降低[8]。因此，Brevinin-2GUb多肽在治疗II型糖尿病方面具有良好的应用前景。

由于从蛙类皮肤分泌物中分离纯化Brevinin-2GUb程序复杂，产量很低，且提取难度大；人工合成生物活性肽是快速获得多肽的另一种重要手段，但人工合成成本高，每个氨基酸大约需要200元[9]。大肠杆菌是表达异源重组蛋白应用最为广泛的宿主之一，具有表达蛋白高效、发酵条件易控制、表达成本低等优势[10]。因此用基因工程的方法在大肠杆菌表达系统中实现Brevinin-2GUb的重组表达并研究其对INS-1细胞的促胰岛素分泌活性，在其用于制备降糖多肽药物方面具有重大的理论意义和经济效益。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

蛙皮素多肽 Brevinin-2GUb 的基因序列为：GGTGTTATTATTGATACTCTGAAAGGTGCTGCTAAAACCGTTGCTGCTGAACTGCTGCGTAAAGCTCACTGCAAACTGACCAACTCTTGC，该基因由生工生物工程（上海）股份有限公司进行合成；克隆菌株为 *E. coli* DH5*α*，表达菌株为 *E. coli* BL21(DE3)，表达载体为 pET32a，均为本实验室保存。

1.1.2 试剂

PrimeSTAR HS Premix、TaKaRa Ex Taq(5 U/μL)均购自日本 Takara 公司；*Dpn* I 限制性内切酶购自美国 ThermoFisher Scientific 公司；DNA 纯化回收试剂盒和质粒小提试剂盒均购自美国 OMEGA 生物公司；蛋白浓度检测试剂盒 Micro BCATM Protein Assay Kit 购自美国 ThermoFisher Scientific 公司；肠激酶购自索莱宝公司。

1.1.3 多肽

人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb 和人工合成的不含二硫键的 Brevinin-2GUb 均由中国上海的 GL Biochem 公司进行人工合成（人工合成含二硫键和不含二硫键的 Brevinin-2GUb 具有相同的氨基酸序列，但不含二硫键的 Brevinin-2GUb 没有形成链内二硫键），通过 RP-HPLC 检测（使用 Gemini-NX 5 μ C18110A，4.6×250 mm 柱）出多肽的纯度分别为 97.59%、96.65%。

1.2 方法

1.2.1 构建重组质粒 pET32a-Trx-His-EK-Brevinin-2GUb

1.2.1.1 Brevinin-2GUb 基因的扩增

以上海生工生物工程有限公司提供的质粒 pUC57-Brevinin-2GUb 为模版，以 Bre-F 和 Bre-R 为引物进行 PCR 扩增 Brevinin-2GUb 目的基因，Bre-F：5'-ACGACGACGACAAGGCCATGGGTGTTATTATTGATACTCTGAAAG-3'，Bre-R：5'-GCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGCAAGAGTTGGTGCAGTTTGCAGTG-3'。100 μL PCR 反应体系为：PrimeStar HS Premix 50 μL；模版 pUC57-Brevinin- 2GUb 1 μL；Bre-F/Bre-R 2 μL；ddH_2O 47 μL。反应条件：98 ℃ 5 min，98 ℃ 10 s，55 ℃ 15 s，72 ℃ 30 s，共 30 个循环；72 ℃ 10 min。扩增完毕后，用 2%琼脂糖凝胶电泳检测，用 OMEGA 公司琼脂糖凝胶回收试剂盒切胶回收。

1.2.1.2 RF 线性扩增反应构建重组质粒 pET32a-Trx-His-EK-Brevinin-2GUb

采用 RF 克隆的方法以质粒 pET32a 为模板，以 1.2.1.1 中回收的 PCR 产物作为引物进行线性扩增反应，25 μL PCR 反应体系为：PrimeStar HS Premix 12.5 μL；模版 pET32a 1 μL；PCR 产物 3 μL；ddH_2O 8.5 μL。反应条件：98 ℃ 5 min，98 ℃ 10 s，55 ℃ 15 s，72 ℃ 7 min，共 24 个循环；72 ℃ 20 min。PCR 结束后，对

PCR 产物进行 *Dpn* I 酶切，20 μL 酶切体系为：*Dpn* I 1 μL；10×Buffer 2 μL；PCR 产物 17 μL。37 ℃酶切反应 1 h。*Dpn* I 酶切反应结束后，将酶切后的产物全部转化大肠杆菌 DH5*α* 感受态中。利用含有氨苄青霉素素（100 μg/mL）的 LB 平板和菌落 PCR 筛选阳性转化子。挑选阳性转化子送至上海生物工程公司测序鉴定。将鉴定正确的重组质粒转化到大肠杆菌 BL21（DE3）中。

1.2.2 融合蛋白 Trx-His-EK-Brevinin-2GUb 在大肠杆菌 BL21（DE3）中的小量表达及表达温度优化

挑取转化平板上含有 pET32a-Trx-His-EK-Brevinin-2GUb 重组质粒的单克隆接种至 6 mL 的氨苄抗性的 LB 液体培养基中进行 37 ℃，220 r/min 过夜培养作为种子液。将种子液按 1:100（*V/V*）的比例接种到 6 支含有 6 mL 新鲜氨苄抗性 LB 液体培养基的试管中，置于 37 ℃，220 r/min 进行培养，当 OD_{600}=0.6~0.8 时，3 支添加 1 mM IPTG 进行诱导，另外 3 支不添加诱导剂 IPTG 作为对照，取 1 支诱导，1 支未诱导共三组分别于 16 ℃、25 ℃、37 ℃诱导表达 20 h、12 h、5 h 进行表达温度优化。诱导表达结束后，对表达后的菌液测定 OD_{600} 并进行收菌。按照每 10 OD 加 1 mL PBS 缓冲液对上述收集的菌体完全悬浮，然后采用超声波破碎菌体。菌体破碎完毕后吸取 80 μL 制备破碎后的全液样品，然后 12000 r/min 离心 2 min 获得破碎后的上清和沉淀，分别吸取 80 μL 制备破碎后的上清和沉淀样品。将 80 μL 样品和上样缓冲液混合后置于沸水浴中煮沸 10 min，12000 r/min 离心 2 min，跑 SDS-PAGE 电泳。

1.2.3 融合蛋白 Trx-His-EK-Brevinin-2GUb 在大肠杆菌 BL21（DE3）中的大量表达及纯化

将含有 pET32a-Trx-His-EK-Brevinin-2GUb 重组质粒的单克隆接种至 8 mL 的氨苄抗性的 LB 液体培养基中，于 37 ℃、220 r/min 过夜培养作为种子液。将种子液按 1:100（*V/V*）的比例接种到 600 mL 新鲜氨苄抗性的 LB 液体培养基中，置于 37 ℃、220 r/min 进行培养，当 OD_{600}=0.6~0.8 时，添加诱导剂 IPTG 至终浓度为 1 mM，然后置于 16 ℃的摇床中诱导表达 20 h。诱导表达结束后，6000 r/min 离心 10 min 收集菌体，用纯化 Buffer A（20 mM Tris，500 mM NaCl，20%甘油，20 mM 咪唑，pH 8.5）重悬，高压破碎菌体后离心收集上清液，然后进行镍柱亲和层析纯化，收集穿过液样品和纯化前后样品进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.4 融合蛋白的肠激酶酶切及纯化

将纯化后的融合蛋白 Trx-His-EK-Brevinin-2GUb 置于 2 L 肠激酶酶切缓冲液（20 mM Tris，50 mM NaCl，3 mM GSH，1 mM GSSG，pH 8.0）中透析 24 h 后，按照每 1 mg 融合蛋白加入 2 U 肠激酶的用量在 25 ℃酶切 24 h。肠激酶酶切后的融合蛋白再次进行镍柱亲和层析纯化，Trx-His-EK 融合蛋白结合到镍柱上，而 Brevinin-2GUb 多肽存在于穿过液中，收集穿过液。将含有 Brevinin-2GUb 多肽的穿过液使用 3 ku 超滤管浓缩并用 PBS 缓冲液进行透析后放置于 4 ℃用于蛋白质定量及活性检测。将浓缩后的 Brevinin-2GUb 多肽与浓度分别为 2.5、2.0、1.5、1.0 μg/孔的人工合成的 Brevinin-2GUb 进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳，通过灰度扫描分析确定 Brevinin-2GUb 浓度。

1.2.5 反相高效液相色谱鉴定重组表达的 Brevinin-2GUb

对人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb 和重组表达的 Brevinin-2GUb 进行反相高效液相色谱检测。仪器为：Waters2695 高效液相色谱仪；C18 色谱柱 Zorbax C18 column (4.6×150 mm，5 Micron）和 2489 紫外可见光检测器。检测条件：流动相 A 为 0.1%三氟乙酸/水，流动相 B 为 0.1%三氟乙酸/乙腈，检测波长 220 nm，流速 1 mL/min；进样量 10 μL。梯度洗脱方法：0.01 min：72% A，28% B；0.01 min~25 min：47% A，53% B；25 min：0% A，100% B；30 min：Stop。

1.2.6 圆二色光谱测定 Brevinin-2GUb 的二级结构

对人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb 和重组表达的 Brevinin-2GUb 进行圆二色光谱测定，分析其主要的二级结构及两者之间是否存在差异。重组表达的 Brevinin-2GUb 在进行圆二色光谱测定前置于 1 L PBS 缓冲液中透析 24 h，使其与人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb 标准品溶液具有相同的溶剂。仪器为英国 Applied Photophysics 公司的 Chirascan Circular Dichroism，检测条件：190~280 nm 波长，1 mm 光程，1 nm 步进，1 nm 带宽，3 次连续扫描取平均值平均，其中 PBS 溶液作为空白对照。最后使用 CDNN 软件分析其二级结构各组分含量。

1.2.7 质谱检测重组表达的 Brevinin-2GUb 是否形成二硫键

通过液相色谱串联质谱检测重组表达的 Brevinin-2GUb 与 DTT 处理后的重组表达的 Brevinin-2GUb 样品，通过对比分析上述两个样品的质谱图来判断重组表达的 Brevinin-2GUb 是否形成二硫键。仪器为美国 Thermo Fisher Scientific 公司的毛细管液相色谱仪 Ultimate 3000 和电喷雾-组合型离子阱 Orbitrap 质谱仪，色谱柱为 packed with Acclaim

PepMap RPLC C18（75 μm i.d.×150 mm，3 μm）。检测条件：所用流动相 A 为 0.1%甲酸，2%乙腈，流动相 B 为 0.1%甲酸，80%乙腈；流速：300 nL/min；液相色谱梯度：59 min，方法：0.01 min：94% A，6% B；0.01 min~5 min：91% A，9% B；5~53 min：50% A，50% B；53~55 min：1% A，95% B；59 min：Stop。二级质谱参数：分辨率：75000；扫描范围：50~2000 *m/z*。

1.2.8 Brevinin-2GUb 的溶血活性测定

在超净工作台中打开 5%脱纤羊血哥伦比亚血平板，在其表面垂直放置 5 个牛津杯。分别取 50 μL 浓度为 85 μg/mL、170 μg/mL 的重组表达的 Brevinin-2GUb、浓度为 250 μg/mL 的人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb、PBS 缓冲液和 0.1%的 Trition X-100 添加到牛津杯中，并进行标记。然后将已经加样的血平板置于 37 ℃恒温培养箱中 16~18 h。其中，无菌的 PBS 溶液作为阴性对照，0.10%的 Trition X-100 作为阳性对照。培养结束后取出牛津杯对血平板进行照相。

1.2.9 Brevinin-2GUb 对 INS-1 细胞的促进胰岛素分泌活性鉴定

将 INS-1 细胞以每孔 2×10^5 个细胞的密度接种 12 孔板中，培养 48 h 后用每孔加入 1 mL 含有 5.6 mM 葡萄糖和 0.2%牛血清白蛋白的 Hanks 缓冲液置于培养箱中平衡 1 h。然后加入终浓度为 10 μg/mL 的 Brevinin-2GUb 置于培养箱中作用 1 h，收集培养上清液 1000 g 离心 20 min，使用胰岛素免疫吸附测定（ELISA）试剂盒测量胰岛素含量。

1.2.10 数据统计分析

所有实验均进行三组平行，结果采用 GraphPad Prism 5 进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 pET32a-Trx-His-EK-Brevinin-2GUb 重组质粒的构建

Brevinin-2GUb 基因大小为 90 bp，以质粒 pUC57-Brevinin-2GUb 为模板，按照 2.3.3 设计引物并进行 PCR 扩增 Brevinin-2GUb 基因，结果如图 1A 所示，在接近 100 bp 处出现明显条带，与连接引物后的 Brevinin-2GUb 基因的理论长度 133 bp 相符，说明成功扩增出 Brevinin-2GUb 基因。

以 pET32a 载体为模板进行 RF 线性扩增反应，PCR 产物经过 *Dpn* I 酶酶切后转化到大肠杆菌 DH5*α* 中，涂板过夜培养。第二天挑取 5 个单克隆（编号为 1~5）以 T7 F、T7 R 为引物进行菌落 PCR 鉴定。取 10 μL PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测，目标条带接近 750 bp，结果如图 1B 所示，5 个单克隆条带均在 750 bp 附近，说明 5 个单克隆均为阳性克隆。挑取其中的 1、2 号单克隆接种摇菌液、提质粒进行测序，测序结果表明 Brevinin-2GUb 基因成功插入 pET32a 载体中正确的位置且没有发生碱基突变，说明两者都是正确的重组质粒 pET32a-Trx-His-EK-Brevinin-2GUb。

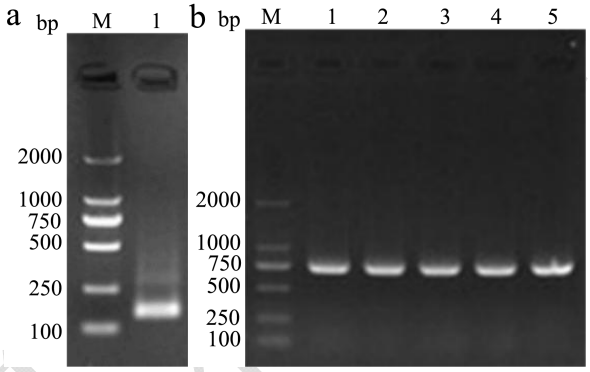


图 1 重组质粒 pET32a-Trx-His-EK-Brevinin-2GUb 的构建

Fig.1 Construction of recombinant plasmid pET32a-Trx-His-EK-Brevinin-2GUb

注：a：目的基因 Brevinin-2GUb 的扩增；M：marker；1：PCR 产物；b：菌落 PCR 验证结果；M：marker；泳道 1~5：挑取的 5 个单克隆。

2.2 融合蛋白的重组表达及纯化

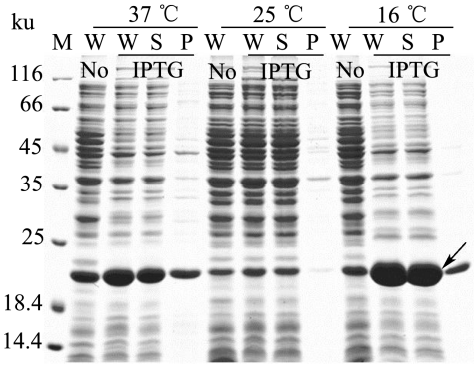


图 2 融合蛋白 Trx-His-EK-Brevinin-2GUb 的表达温度优化

Fig.2 Temperature optimizationof recombinant fusion protein Trx-His-EK-Brevinin-2GUb

注：M：marker；W：细胞裂解全液；S：细胞裂解上清；P：细胞裂解沉淀；No：未诱导；IPTG：1 mM IPTG 诱导。

对重组表达菌株 pET32a-Trx-His-EK-Brevinin-2GUb-BL21（DE3）进行小量表达及表达温度优化。结果如图 2 所示，融合蛋白 Trx-His-EK-Brevinin-2GUb 成功表达（黑色箭头所指），在所实验的三个表达温度中 25 ℃表达量最低，在 16 ℃的条件下表达量最高且

绝大部分以可溶形式存在。因此，最终选择 16 ℃作为融合蛋白 Trx-His-EK-Brevinin-2GUb 的最适表达温度。

在 1 L LB 液体培养基中对融合蛋白 Trx-His-EK-Brevinin-2GUb 进行 16 ℃诱导表达以期获得大量蛋白，采用镍柱亲和层析进行纯化。结果如图 3 所示，当低浓度咪唑流过时，融合蛋白挂在柱上，仅有少量被洗脱下来，咪唑浓度为 250 mM 时绝大部分的融合蛋白（黑色箭头所指）被洗脱下来。

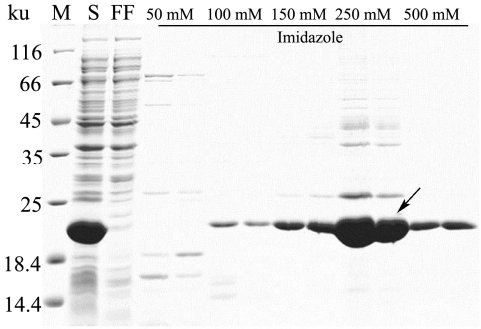


图 3 融合蛋白 Trx-His-EK-Brevinin-2GUb 的大量表达及纯化

Fig.3 Expression and purification of fusion protein Trx-His-EK-Brevinin-2GUb by nickel ion affinity chromatography

注：M：marker；S：细胞裂解上清；FF：穿过液。

2.3 融合蛋白的肠激酶酶切及纯化

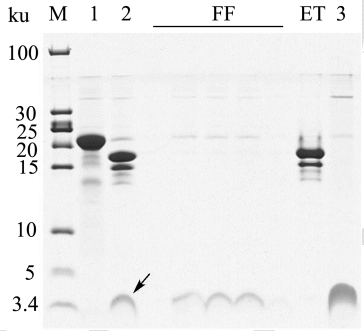


图 4 融合蛋白肠激酶酶切及无标签 Brevinin-2GUb 蛋白纯化

Fig.4 Purification of enterokinase-cleaved Brevinin-2GUb by nickel ion affinity chromatography

注：M：marker；1：EK 酶切前的融合蛋白 Trx-His-EK-Brevinin-2GUb；2：EK 酶切后的融合蛋白 Trx-His-EK-Brevinin-2GUb；FF：穿过液；ET：500 mM 咪唑洗脱液；3：浓缩后的 Brevinin-2GUb。

将初步纯化后的融合蛋白进行肠激酶酶切，酶切结束后，进行镍柱亲和层析纯化得到无任何标签的 Brevinin-2GUb 多肽。结果如图 4 所示，泳道 1 为肠激酶酶切前的融合蛋白 Trx-His-EK-Brevinin-2GUb，泳道 2 为 Trx-His 标签蛋白和 Brevinin-2GUb（黑色箭头所指）的酶切混合液。酶切混合液经过层析柱时，由于 Trx-His 蛋白带有 His 标签而重新挂柱，而 Brevinin-2GUb（泳道 FF）则从穿过液中流出，穿过液中的 Brevinin-2GUb（黑色箭头所指）则使用超滤管进行浓缩。

以人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb 作为标准品对浓缩后的 Brevinin-2GUb 多肽进行定量，结果如图 5 所示，通过 ImageJ 软件进行灰度扫描分析计算测得浓缩后 Brevinin-2GUb（泳道 1）浓度约为 170 μg/mL。

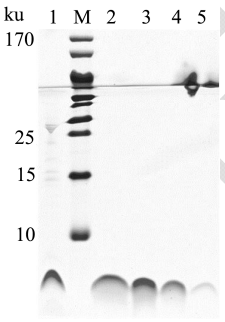


图 5 Brevinin-2GUb 的相对定量

Fig.5 Relative quantification of Brevinin-2GUb

注：M：marker；泳道 1：浓缩后的 Brevinin-2GUb；泳道 2~5：2.5，2.0，1.5，1.0 μg 人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb。

2.4 反相高效液相色谱鉴定重组表达的 Brevinin-2GUb

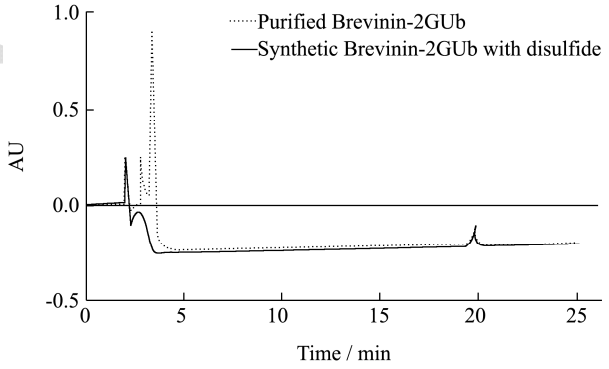


图 6 Brevinin-2GUb 的液相色谱图

Fig.6 RP-HPLC chromatogrphy of Brevinin-2GUb

人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb 和重组表达的 Brevinin-2GUb 的反相高效液相色谱检测结果如图 6 所示，从图中可以看出人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb 和重组表达的 Brevinin-2GUb 在相同的时间 19.81 min 处出现明显的峰，说明两者具有相同的保留时间，即具有相同的一级结构。结果表明重组表达的融合蛋白 Trx-His-EK-Brevinin-2GUb 经过肠激酶酶切纯化后获得的 Brevinin-2GUb 多肽的氨基酸序列与人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb 的氨基酸序列一致。

2.5 圆二色光谱测定 Brevinin-2GUb 的二级结构

人工合成含二硫键和不含二硫键的 Brevinin-2GUb 和重组表达的 Brevinin-2GUb 的圆二色光谱检测结果如图 7 所示，使用 CDNN 软件分析 Brevinin-2GUb 的二级结构各组分含量如下表 1 所示，重组表达的 Brevinin-2GUb 在 PBS 溶液中的 α-螺旋结构含量为 85.80%，人工合成含二硫键和不含二硫键的 Brevinin-2GUb 的 α-螺旋结构含量分别为 86.60%和 86.20%，通过对比发现重组表达的 Brevinin-2GUb 在 PBS 溶液中的 α-螺旋结构含量比人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb 的 α-螺旋结构含量有所降低。

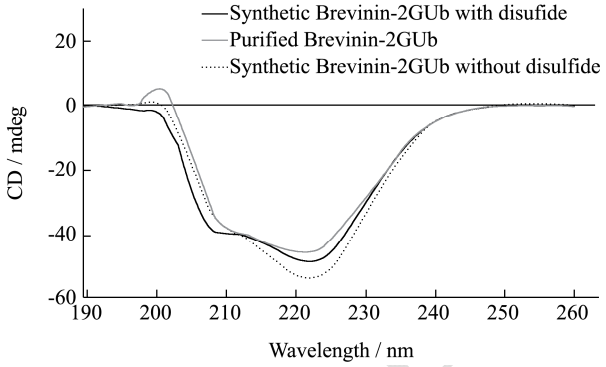


图 7 Brevinin-2GUb 的圆二色光谱检测图谱

Fig.7 Circular Dichroism analysis of Brevinin-2GUb

表 1 CDNN 软件分析 Brevinin-2GUb 的二级结构

Table 1 The secondary structure analysis of Brevinin-2GUb by CDNN

	Wavelength190-260 nm		
	人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb	重组表达的 Brevinin-2GUb	人工合成不含二硫键的 Brevinin-2GUb
Helix/%	86.60	85.80	86.20
Atiparallel/%	0.20	0.10	0.10
Parallel/%	1.10	1.40	1.40
Beta-turn/%	9.20	8.80	8.40
Rndm.Coil/%	2.60	3.70	4.10
Total Sum/%	99.60	99.80	100.20

2.6 质谱检测重组表达 Brevinin-2GUb 是否形成二硫键

对重组表达并经过浓缩后的 Brevinin-2GUb 烷基化后进行液相色谱串联质谱检测，通过与使用 DTT 处理后烷基化的重组表达的 Brevinin-2GUb 样品的质谱结果进行对比来分析 Brevinin-2GUb 是否形成二硫键。其中 DTT 是一种强还原剂，可以将二硫键打断，若重组表达的 Brevinin-2GUb 没有形成二硫键，其半胱氨酸会被烷基化，质谱结果应与使用 DTT 处理后烷基化的重组表达的 Brevinin-2GUb 的质谱结果一致，仅检测到烷基。Brevinin-2GUb 的质谱结果如图 8 所示，其中 a 为重组表达 Brevinin-2GUb 肽段的二级质谱图，b 为经过 DTT 处理后的重组表达 Brevinin-2GUb 肽段的二级质谱图。结果发现，在经过 DTT 处理后的重组表达 Brevinin-2GUb 样品中仅检测到烷基无二硫键；而重组表达的 Brevinin-2GUb 样品中绝大部分肽段都形成了二硫键，但在其中一条肽段中检测到了烷基，说明这条肽段没有形成二硫键，表明重组表达的 Brevinin-2GUb 虽然形成了二硫键，但其二硫键的形成并不完全。

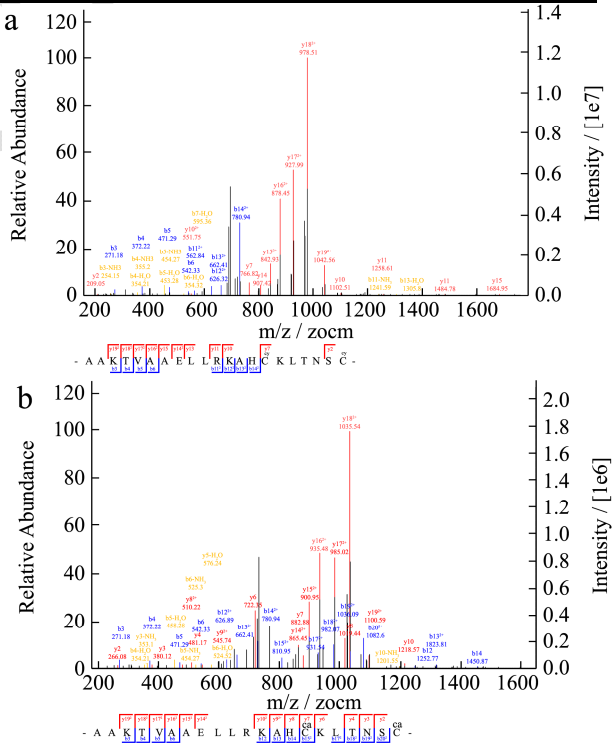


图 8 Brevinin-2GUb 肽段的二级质谱图

Fig.8 Secondary mass spectrum of the Brevinin-2GUb peptide

注：a：重组表达 Brevinin-2GUb 肽段的二级质谱图；b：经过 DTT 处理后的重组表达 Brevinin-2GUb 肽段的二级质谱图。

2.7 Brevinin-2GUb 的溶血活性分析

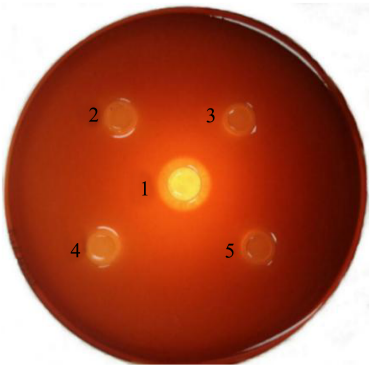


图 9 Brevinin-2GUb 抗菌肽的溶血性能测定

Fig.9 Hemolytic assay of brevinin-2GUb peptide against mammalian erythrocytes.

注：1：0.10%的 TritionX-100 作为阳性对照；2：PBS 缓冲液作为阴性对照；3-4：浓度分别为 85、170 μg/mL 重组表达的 Brevinin-2GUb；5：浓度为 250 μg/mL 的人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb。

血平板检测 Brevinin-2GUb 多肽的溶血特性，结果如图 9 所示，血平板上除了添加了 0.1%的 Trition X-100（阳性对照，图中 1 所示位置）的位置出现了明显的抑菌圈之外，Brevinin-2GUb 多肽均未出现溶血情况。说明不管是浓度为 250 μg/mL 的人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb 多肽，还是浓度为 170 μg/mL 的重组表达的 Brevinin-2GUb 多肽均无溶血活性。

2.8 Brevinin-2GUb 的促胰岛素分泌活性鉴定

由图 10 可知，10 μg/mL 人工合成的 Brevinin-2GUb（含二硫键和不含二硫键两种）和重组表达的 Brevinin-2GUb 在 5.6 mM 葡萄糖存在的条件下对 INS-1 细胞胰岛素的分泌具有显著的促进作用。其中人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb 对 INS-1 细胞胰岛素的分泌具有极显著（基础分泌量的 181.25%，$p<0.001$）的促进作用；人工合成不含二硫键的 Brevinin-2GUb 和重组表达的 Brevinin-2GUb 对 INS-1 细胞胰岛素的分泌具有显著（分别为基础分泌量的 129.63%和 120.04%，$p<0.01$）促进作用。通过显著性分析发现人工合成不含二硫键的 Brevinin-2GUb 和重组表达的 Brevinin-2GUb 对 INS-1 细胞胰岛素的分泌作用没有显著性差异。由图 9 可知，人工合成不含二硫键的 Brevinin-2GUb 的促胰岛素分泌活性是人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb 的促胰岛素分泌活性的 71.54%，表明 Brevinin-2GUb 在二硫键没有正确形成的情况下其促胰岛素分泌活性会降低，证明 Brevinin-2GUb 的二硫键对其促胰岛素分泌活性具有重要作用。

通过对比人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb 和重组表达的 Brevinin-2GUb 对 INS-1 细胞胰岛素的分泌作用发现，重组表达的 Brevinin-2GUb 的促胰岛素分泌活性是人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb 的促胰岛素分泌活性的 66.23%，表明重组表达的 Brevinin-2GUb 的促胰岛素分泌活性弱于人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb 的促胰岛素分泌活性。圆二色光谱检测结果表明，重组表达的 Brevinin-2GUb 的 α-螺旋结构含量比人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb 的 α-螺旋结构含量有所降低；质谱结果表明重组表达的 Brevinin-2GUb 虽然形成了二硫键，但二硫键的形成并不完全。所以极大可能是由于重组表达的 Brevinin-2GUb 多肽与人工合成的含二硫键的 Brevinin-2GUb 多肽的空间结构存在一定差异，最终导致我们通过大肠杆菌重组表达获得的 Brevinin-2GUb 的促胰岛素分泌活性弱于人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb。

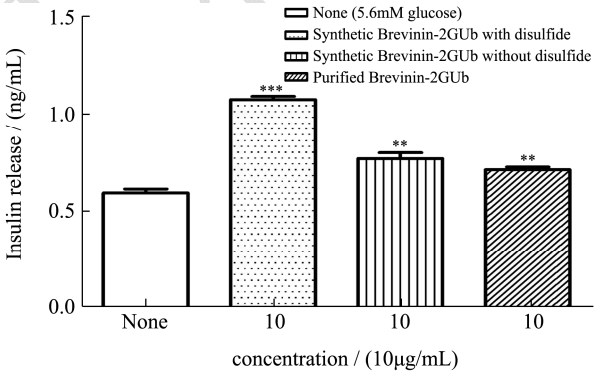


图 10 Brevinin-2GUb 对 INS-1 细胞分泌胰岛素的影响

Fig.10 Effects of Brevinin-2GUb on insulin release against INS-1 cells

注：** $p<0.01$，*** $p<0.001$，与空白对照进行比较。

3 结论

3.1 目前，大肠杆菌系统是应用最为广泛的蛋白质表达系统之一，因为大肠杆菌表达系统具有表达蛋白高效、发酵条件易控制、表达成本低等优势。所以本研究选择大肠杆菌作为重组表达 Brevinin-2GUb 的宿主。由于 Brevinin-2GUb 具有抗菌活性，对宿主细胞具有一定的杀伤作用，因此进行 Brevinin-2GUb 的重组表达时将其与硫氧还蛋白进行融合表达，融合标签的存在可在蛋白表达过程中使宿主免受伤害。最后进一步通过肠激酶酶切融合蛋白后可获得不带任何标签的 Brevinin-2GUb，产量约为 2.50 mg/L，纯度可达 90%以上，成功实现降糖多肽 Brevinin-2GUb 在大肠杆菌中的高效表达。170 μg/mL 的重组表达 Brevinin-2GUb

多肽无溶血效应，为 Brevinin-2GUb 多肽在医药领域的应用奠定了基础。

3.2 在本研究中，使用 INS-1 细胞进行 Brevinin-2GUb 的促胰岛素分泌活性鉴定。INS-1 细胞与 BRIN-BD11 细胞相似，均可在葡萄糖刺激下分泌胰岛素。结果表明，在相同浓度下人工合成不含二硫键的 Brevinin-2GUb 的促胰岛素释放量为人工合成含二硫键的 Brevinin-2GUb 的 71.54%，说明 Brevinin-2GUb 中的二硫键对促胰岛素分泌活性具有重要作用。重组表达的 Brevinin-2GUb 多肽在浓度为 10 μg/mL 时对 INS-1 细胞产生显著的刺激胰岛素分泌作用（为基础释放量的 120.04%；p<0.01）。此研究为 Brevinin-2GUb 多肽开发为降糖口服液及多肽药物奠定了基础。

参考文献

[1] Ogurtsova K, Da Rocha Fernandes J D, Huang Y, et al. IDF diabetes atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040 [J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2017, 128: 40-50

[2] Guariguata L, Whiting D R, Hambleton I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035 [J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2014, 103(2): 137-149

[3] Cho N H, Shaw J E, Karuranga S, et al. IDF diabetes atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2018, 138: 271-281

[4] Conlon J M, Power G J, Abdel-Wahab Y H, et al. A potent, non-toxic insulin-releasing peptide isolated from an extract of the skin of the Asian frog, *Hylarana guntheri* (Anura: *Ranidae*) [J]. Regulatory Peptides, 2008, 151(1-3): 153-159

[5] Oskuee F Z, Saa J R. Biological properties, current applications and potential therapeautic applications of brevinin peptide superfamily [J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2018, 25(1): 39-48

[6] Mechkarska M, Meetani MA, Coquet L, et al. Peptidomic analysis of skin secretions from the bullfrog *Lithobates catesbeianus* (*Ranidae*) identifies multiple peptides with potent insulin-releasing activity [J]. Peptides, 2011, 32(2): 203-208

[7] Abdel-Wahab Y H, Patterson S, Flatt P R, et al. Brevinin-2-related peptide and its [D4K] analogue stimulate insulin release in vitro and improve glucose tolerance in mice fed a high fat diet [J]. Hormone and Metabolic Research, 2010, 42(9): 652-656

[8] 周庆峰,赵文峰,马亢,等.蛙皮抗菌肽 Brevinin-2Gub 对 2 型糖尿病大鼠体重、血糖和胰岛素水平的影响[J].中国老年学杂志,2013,12(33):5904-5906
ZHOU Qing-feng, ZHAO Wen-feng, MA Kang, et al. Effects of frog skin antibacterial peptide Brevinin-2Gub on body weight, blood glucose and insulin levels in type 2 diabetic rats [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2013, 12(33): 5904-5906

[9] 曲朋,宋利,赵好冬,等.多肽合成研究进展[J].中国现代中药,2015,17(3):285-289
QU Peng, SONG Li, ZHAO Hao-dong, et al. Research progress of peptide synthesis [J]. Modern Chinese Medicine, 2015, 17(3): 285-289

[10] Zhao J, Yu HY, Zhao Y, et al. Soluble expression, rapid purification, biological identification of chicken interferon-alpha using a thioredoxin fusion system in *E. coli* and its antiviral effects to H9N2 avian influenza virus [J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2019, 49: 192-20

（上接第 29 页）

[35] Yang L, Zhou Y, Li Y, et al. Mutations of p53 and KRAS activate NF-κB to promote chemoresistance and tumorigenesis via dysregulation of cell cycle and suppression of apoptosis in lung cancer cells [J]. Cancer Letters, 2015, 357(2): 520-526

[36] 崔海鹏.Ras/MAPK/ERK 与 mTOR、NF-κB 协同调控肝肿瘤细胞 cyclin D1 表达机制的研究[D].辽宁:大连医科大学,2015
CUI Hai-peng. Cyclin D1 induced by Ras/MAPK/ERK collaborating with mTOR and NF-κB in liver tumor [D]. Liaoning: Dalian Medical University, 2015