

一种新型杂合抗菌肽在毕赤酵母中的表达及其抗菌活性

王书全 李明 马鸣潇

【摘要】目的 在毕赤酵母中表达杂合抗菌肽 CA(1-11)CD(12-37)ME(1-18)(ADM) 并检测其抗菌活性。方法 根据毕赤酵母(*Pichia pastoris*)偏爱密码子,合成杂合抗菌肽 CA(1-11)CD(12-37)ME(1-18)基因,插入 pPIC9K 载体,构建重组表达质粒 pPIC9K-ADM,电转化至毕赤酵母 GS115,筛选阳性菌株,甲醇诱导表达,Tricine-SDS-PAGE 检测 ADM 蛋白的表达,并对其抗菌活性进行初步检测。结果 重组表达质粒 pPIC9K-ADM 经双酶切和测序鉴定证明构建正确,阳性酵母转化子的 PCR 产物可见目的基因条带,杂合抗菌肽在毕赤酵母 GS115 中获得分泌表达,可溶性蛋白约占菌体总蛋白的 13%;且对 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* JM109 和金黄葡萄球菌具有一定的抗菌活性。结论 已在毕赤酵母 GS115 中表达了具有一定抗菌活性的杂合抗菌肽 ADM,为相关新药的研究奠定了基础。

【关键词】杂合子 抗菌肽 毕赤酵母 基因表达 抗菌活性

【中国图书分类号】R978.1 Q789 【文献标识码】A 【文章编号】1004-5503(2011)02-0173-04

Expression of a Novel Hybrid Antibacterial Peptide in *Pichia pastoris* and Its Antibacterial Activity

WANG Shu-quan, LI Ming, MA Ming-xiao (Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China)

【Abstract】 **Objective** To express hybrid antibacterial peptide CA (1-11) CD (12-37) ME (1-18) (ADM) in *Pichia pastoris* and determine its antibacterial activity. **Methods** Hybrid antibacterial peptide ADM gene was synthesized by using *P. pastoris*-referent codon, and inserted into vector pPIC9K. The constructed recombinant plasmid pPIC9K-ADM was transformed to *P. pastoris* GS115 by electron transformation, and positive recombinants were screened for expression under induction of methanol. The expressed ADM protein was identified by Tricine-SDS-PAGE and determined for antibacterial activity. **Results** Both restriction analysis and sequencing proved that recombinant plasmid pPIC9K-ADM was constructed correctly. Target gene fragment was amplified from the positive recombinants. Hybrid antibacterial peptide ADM was expressed in *P. pastoris* GS115. The expressed product in soluble form contained about 13% of total somatic protein, and showed certain antibacterial activities to *E. coli* DH5 α , *E. coli* JM109 and *S. aureus*. **Conclusion** The hybrid antibacterial peptide with a certain antibacterial activity was expressed in *P. pastoris* GS115, which laid a foundation of development of relevant new drugs.

【Key words】 Heterozygote; Antibacterial peptide; *Pichia pastoris*; Gene expression; Antibacterial activity

目前,抗生素的耐药性问题已引起人们的广泛关注,因此,研制新型抗生素或其替代品已迫在眉睫^[1-2]。迄今为止,已有 500 多种抗菌肽被分离鉴定,可大致分为 4 类:天蚕素(Ceropins)、蛙皮素(Magainin)、蜂毒素(Melittin)、防御素(Denfensin)。这些抗菌肽除了具有广谱的抗菌活性外,还具有高效的抗真菌、抗病毒、抗肿瘤活性。随着对抗菌肽作用机制、分子结构与功能关系等研究的逐步深入,人们在发掘新抗菌肽的同时,更注重寻找高效、广谱、低毒、肽链较短的抗菌肽,杂合肽即为一类这样的新型抗菌肽^[3-5]。人工设计杂合肽是目前研究的热点之一,即选择一种抗菌肽为蓝本,对某些氨基酸进行

替换、删减其本身的一些氨基酸残基、在此基础上与另外一种抗菌肽的片段拼接。研究表明,一些经过改造的抗菌肽具有与蓝本相似或更高的活性,毒副作用降低,而且变短的肽链也为降低合成成本奠定了基础^[6-7]。

毕赤酵母具有对外源蛋白翻译后正确加工、安全性好且易于发酵等特点,已广泛应用于基因工程产品的生产^[8-12]。本实验人工合成杂合抗菌肽 CA(1-11)CD(12-37)ME(1-18)(ADM),在毕赤酵母中进行表达,并对其生物活性进行鉴定,为相关新药的研发奠定了基础。

1. 材料与方法

1.1 菌株及质粒

大肠杆菌 DH5 α 购自 TaKaRa 公司; *E. coli*

基金项目:辽宁省教育厅资助(2008427)。

作者单位:辽宁医学院(辽宁锦州 121000)。

通讯作者:马鸣潇, E-mail: lnmwqsq1968@126.com

JM109 和金黄葡萄球菌(*S. aureus*)为辽宁医学院畜牧兽医学院微生物实验室保存;毕赤酵母菌 GS115 和毕赤酵母穿梭表达载体 pPIC9K 购自 Promega 公司。

1.2 主要试剂

质粒小量提取纯化试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒和基因组提取试剂盒为北京威格拉斯技术有限公司产品;DNA marker DL2000 和 DNA marker λ -EcoT14 为宝生物工程(大连)有限公司产品;限制性内切酶 SnaB、Not、Taq 聚合酶和 DNA Ligation Kit Ver. 2.1 为 TaKaRa 公司产品;Lipofectamine™ 2000 为 Invitrogen 公司产品。

1.3 基因的设计及合成

根据 GenBank 中登录的几种抗菌肽的成熟肽段氨基酸序列(0708214A、CAA29872、P68408),选用酵母偏爱密码子,利用 DNASTAR 软件设计杂合抗菌肽 CA(1-11)CD(12-37)ME(1-18),为了保证抗菌肽 CA(1-11)CD(12-37)(AD)与 ME 具有天然 N-端,在其 N-端加上 Kex2 蛋白酶裂解位点,在 C-端添加上终止密码子 TAA,并在两端分别引入 SnaB 和 Not 酶切位点,基因全长 198 bp,由宝生物工程(大连)有限公司协助合成。

1.4 重组表达质粒的构建

将合成的抗菌肽基因片段及 pPIC9K 质粒分别经 SnaB 和 Not 双酶切,回收目的基因片段及载体片段,按摩尔体系比 4:1 经 DNA Ligation Kit Ver. 2.1 16℃连接过夜,连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,涂布于含 50 mg/L 氨苄西林的 LB 琼脂板,倒置于 37℃恒温箱中过夜培养;次日挑取单菌落,接种于 10 ml 含 50 mg/L 氨苄西林的 LB 培养基中,37℃振荡培养过夜;提取质粒,进行双酶切 SnaB / Not 鉴定,阳性菌液送上海生工生物工程技术服务有限公司测序,测序正确的重组质粒命名为 pPIC9K-ADM。

1.5 酵母转化

将重组表达质粒 pPIC9K-ADM 和空载体 pPIC9K 分别电击转化感受态毕赤酵母 GS115,涂布于 MD 平板,30℃ 孵育 2~3 d,将阳性菌株分别接种于 MM 和 MD 选择培养基平板上,挑选在 MM 平板上生长缓慢,而在 MD 平板生长良好的菌株(His⁺Mut⁺表型),用基因组提取试剂盒提取酵母基因组 DNA,以其为模板,用酵母载体上通用引物(α -Factor 5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'和 3'AOX1 5'-GC-AAATGGCATTCTGACATCC-3',购自上海生工生物工程技术服务有限公司)进行 PCR 扩增。反应条件

为 94℃预变性 5 min,94℃ 1 min,55.5℃ 1 min,72℃ 1 min,共 30 个循环,最后 72℃延伸 10 min。扩增产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.6 目的基因的诱导表达

将阳性转化子接种于 100 ml BMGY 培养基中,30℃培养至菌体 $A_{600} = 5.8$ 时,5 000 r/min 离心 15 min,收集菌体,经 20 ml BMMY 培养基重悬,继续培养,每隔 24 h 加入终浓度为 1%的甲醇诱导表达,5 d 后离心收集菌体和上清,进行 Tricine-SDS-PAGE 分析^[13]。

1.7 杂合抗菌肽抗菌活性的测定

采用琼脂孔穴扩散法,以 *E. coli* DH5 α 为实验菌株,将 10 μ l $A_{600} = 0.5$ 的 *E. coli* DH5 α 菌悬液与 25 ml 50℃ LB 固体培养基混匀后倒平板,待其凝固后用无菌打孔器(直径 5 mm)打孔,在孔中加入 30 μ l GS115/pPIC9K-ADM 诱导表达上清(ADM 含量为 2.3 μ g),37℃培养 8~10 h,观察并测量抑菌圈直径。以加入 15 μ l Amp(20 mg/ml)作为阳性对照,GS115/pPIC9K 的诱导表达上清作为阴性对照。

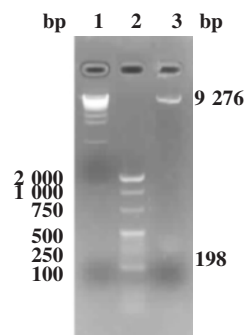
1.8 杂合抗菌肽抗菌谱的测定

按照 1.7 项方法检测抗菌肽对 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* JM109 和金黄葡萄球菌的抑菌效果。

2. 结果

2.1 重组表达质粒的鉴定

重组表达质粒 pPIC9K-ADM 的双酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分析,可见 198 bp 和 9 276 bp 两条带,大小均与预期一致,见图 1。测序结果表明重组表达质粒构建正确。



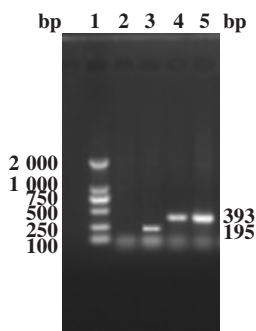
1 DNA marker λ -EcoT14 2 DNA marker DL2000 ;
3 质粒 pPIC9K-ADM 经 SnaB 和 Not 双酶切

图 1 重组表达质粒 pPIC9K-ADM 的双酶切鉴定

Fig 1. Restriction map of recombinant plasmid pPIC9K-ADM

2.2 酵母转化子的鉴定

GS115 / pPIC9K-ADM 的 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析 ,可见 393 bp 的条带(抗菌肽与侧翼 α 因子信号肽 195 bp 之和) ,而空载体转化子可见 195 bp 的条带 ,阴性转化子未见特异条带 ,见图 2。



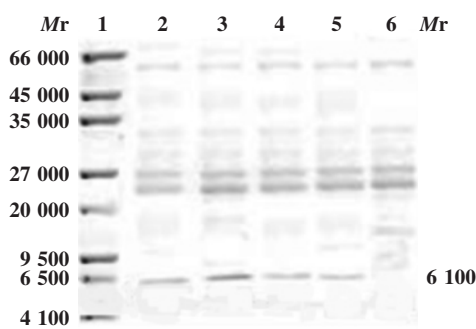
1 :DNA marker DL2000 ; 2 :阴性转化子的 PCR 产物 ; 3 :空载体转化子的 PCR 产物 ; 4 5 :GS115 / pPIC9K-ADM 的 PCR 产物

图 2 酵母转化子的 PCR 鉴定

Fig 2. Identification of transformed *P. pastoris* by PCR

2.3 表达产物的鉴定

GS115 / pPIC9K-ADM 的诱导表达上清经 Tricine-SDS-PAGE 分析 ,在相对分子质量约 6 100 处可见特异的蛋白表达条带 ,大小与预期相符 ,见图 3。薄层扫描分析显示 ,上清中的可溶性蛋白约占菌体总蛋白的 13%。



1 :蛋白质 marker 2 ~ 5 :GS115 / pPIC9K-ADM 的诱导表达上清 ; 6 :GS115 / pPIC9K 对照

图 3 表达产物的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig 3. Tricine-SDS-PAGE profile of expressed product

2.4 杂合抗菌肽的抗菌活性

试验结果表明 ,杂合抗菌肽 ADM 对 *E. coli* DH5 α 有较好的杀菌活性 ,抑菌直径可达 14. 8 mm , Amp 的抑菌圈直径为 15. 5 mm ,空载体转化酵母的表达

上清无抑菌活性。

2.5 杂合抗菌肽的抗菌谱

试验结果显示 ,杂合抗菌肽 ADM 对 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* JM109 和金黄色葡萄球菌均有不同程度的抑制作用 ,见表 1。

表 1 杂合抗菌肽的抗菌谱

Tab 1. Antibiogram of ADM

实验菌株	抑菌圈直径(mm)
<i>E. coli</i> DH5 α	14 ~ 17
<i>E. coli</i> JM109	10 ~ 13
<i>S. aureus</i>	6 ~ 9

3. 讨论

采用基因工程技术生产抗菌肽具有活性高、产量大、成本低廉、生产速度快、易于规模化生产等优点 [14]。毕赤酵母是近几年发展起来的一种新型真核表达系统 ,可对外源蛋白进行加工、折叠、翻译后修饰(信号肽切割、蛋白折叠、二硫键的形成、某些脂类的添加以及 O-联和 N-联糖基化等) ,并将其分泌至培养基中 ,分离纯化简便 ,是一种较为理想的真核表达系统 [15]。

本文选用酵母偏爱密码子 ,通过人工设计合成了杂合抗菌肽 CA(1-11)CD(12-37)ME(1-18)。CA(1-11)CD(12-37)ME(1-18)是由天蚕素 A1-11 氨基酸残基、天蚕素 D12-37 氨基酸残基和蜂毒素的 1-18 氨基酸残基组成的 1 个杂合分子 ,其 N-端为天蚕素部分 ,C-端为蜂毒素部分。本实验将 CA(1-11)CD(12-37)ME(1-18) 插入酵母表达载体 pPIC9K 的 α 因子信号肽下游 ,构建了重组分泌表达质粒 pPIC9K-ADM ,转化毕赤酵母 GS115 后 ,成功筛选到阳性重组酵母 GS115 / pPIC9K-ADM ,诱导表达产物杂合抗菌肽具有较好的抑菌活性 ,为相关新药的研发奠定了基础。

参考文献

[1] 舒黛廉 ,任敏 ,王珏. 抗菌肽研究现状及其在畜牧业中的应用前景 [J]. 中国畜牧兽医 ,2007 ,34 (6) :100-104.
 [2] 丁长才 ,苏志坚 ,王艳萍 ,等. 一种抗菌肽和 aFGF 融合蛋白的构建和表达 [J]. 中国生物工程杂志 ,2006 ,26(1) :27-32.
 [3] 徐建华 ,朱家勇 ,金小宝 ,等. 家蝇幼虫抗菌肽天蚕素基因的克隆及其在大肠杆菌中融合表达 [J]. 中国人兽共患病学报 ,2007 ,23 (4) :311-318.
 [4] Dubin A , Mak P , Dubin G , et al. New generation of peptide antibiotics [J]. Acta Biochim Pol , 2005 , 52 (3) :633-638.
 [5] McPhee JB , Hancock RE. Function and therapeutic potential of host defence peptides [J]. J Pept Sci , 2005 , 11 (11) :677-687.

(下转第 178 页)

间无相关性。本文以凝血酶和钙剂代替深低温保存,对血小板释放的 TGF- β 1 浓度与年龄、性别之间的相关性进行了分析,结果表明,年龄、性别不是 TGF- β 1 浓度的决定因素($P > 0.05$),与 Weibrich 等的研究结果一致。

本研究表明,静脉血中血小板计数与 PRP 中的血小板计数呈正相关($r_p = 0.65$, $P < 0.05$),表明血袋法制备 PRP 不易受操作因素的影响,结果客观、稳定,可重复性强,同时提示,血袋法制备 PRP 的血小板计数可根据静脉血中的血小板计数来预测。关于血小板计数与 TGF- β 1 浓度的相关性报道不一。从理论上讲,APG 释放的 TGF- β 1 浓度与血小板计数密切相关,血小板计数越高, TGF- β 1 的浓度就越高^[3-5]。但亦有研究表明,APG 释放的生长因子浓度与血小板计数无关^[6-7]。本研究采用多元线性回归分析法,对相关因素与 TGF- β 1 浓度的相关性进行了分析,发现无论是静脉血中的血小板计数,还是 PRP 中的血小板计数,均与 TGF- β 1 浓度无关,原因可能为:①血小板中生长因子的含量个体差异极大, TGF- β 1 含量从(35 ± 8) ng/ml 到(120 ± 42) ng/ml 不等^[7];② APG 中的血小板可能未被完全激活^[8]。因此,我们认为不能根据静脉血及 PRP 中的血小板计数来推测 TGF- β 1 的浓度。

血小板在 4℃ 保存时,活性很快下降,6 h 后仅有约 40% 的活性,12 h 后活性仅剩 20%; 低于 20℃ 时,血小板会发生显著的改变,包括从静止盘形到多伪足球形的改变、丝状肌动蛋白的增加、血小板微管螺管的解聚、细胞内 Ca²⁺ 的剧增、溶酶体和 α 颗粒的分泌和融合等^[9]。APG 中生长因子释放是一个复杂的过程,影响因素较多。本研究结果表明,温度是决

定 TGF- β 1 浓度的关键因素($P < 0.05$),室温下保存的血小板,其活力高于 4℃ 保存的血小板,提示采集的静脉血来不及制备 APG 时,需在室温下保存,最大程度地保持血小板活性,以获得较高的 TGF- β 1 浓度。

参考文献

- [1] Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications [J]. J Orthop Trauma, 2008, 22 (6): 432-438.
- [2] Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, et al. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count [J]. J Craniomaxillofac Surg, 2002, 30 (2): 97-102.
- [3] Sethi PM, Miranda JJ, Kadiyala S, et al. Evaluation of autologous platelet concentrate for intertransverse process lumbar fusion [J]. Am J Orthop (Belle Mead NJ), 2008, 37 (4): E84-E90.
- [4] 袁南兵,王椿,王艳,等.自体富血小板凝胶的制备及其生长因子分析 [J].中国修复重建外科杂志,2008,22(4):468-471.
- [5] Schmidmaier G, Herrmann S, Green J, et al. Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, iliac crest, and platelet preparation [J]. Bone, 2006, 39 (5): 1156-1163.
- [6] Sutter WW, Kaneps AJ, Bertone AL. Comparison of hematologic values and transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood [J]. Am J Vet Res, 2004, 65 (7): 924-930.
- [7] Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing [J]. Plast Reconstr Surg, 2004, 114 (6): 1502-1508.
- [8] Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery [J]. Plast Reconstr Surg, 2006, 118 (6): 147e-159e.
- [9] 刘景汉,车辑.血小板保存 [J].中国输血杂志,2008,21(4):241-242.

(收稿日期 2010-07-10)

(上接第 175 页)

- [6] Boman HG, Wade D, Boman IA, et al. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids [J]. FEBS Lett, 1989, 259 (1): 103-106.
- [7] 冯兴军,王建华,单安山.抗菌肽基因工程研究及其表达策略 [J].中国生物工程杂志,2006,26(3):63-67.
- [8] 张素芳,贾赞,蔡梅红,等. Magainin 和 cecA-mil 抗菌肽基因的密码子优化及在毕赤酵母中的高效表达 [J].中国生物工程杂志,2004,24(7):93-97.
- [9] 尹娜,李鸿钧,彭梅,等.抗菌肽 Cecropin D 在毕赤酵母中的表达、纯化及活性鉴定 [J].中国生物制品学杂志,2008,21(3):185-189.
- [10] 江丽娜,韩文瑜,雷连成,等. Catesbeianin-1 在毕赤酵母中的表达及其体外生物活性 [J].中国生物制品学杂志,2010,23(2):134-137,145.
- [11] 田生礼,邵睿,刘刚,等.碱性纤维素酶基因在巴氏毕赤酵母中

的表达及重组酵母菌发酵工艺的优化 [J].中国生物制品学杂志,2009,22(5):425-430.

- [12] 王龙刚,王宇凯,何成,等.混合补料诱导高拷贝重组毕赤酵母高效表达 X-HBsAg [J].中国生物制品学杂志,2010,23(5):521-525.
- [13] 牛明福,李翔,曹瑞兵,等.复合抗菌肽 PL 在毕赤酵母中的分泌表达及其活性研究 [J].生物工程学报,2007,23(3):418-422.
- [14] Piers KL, Brown MH, Hancock RE. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria [J]. Gene, 1993, 134 (1): 7-13.
- [15] 张素芳,曹瑞兵,贾赞,等.杂合抗菌肽 CecA-mil 的改造及在毕赤酵母中的分泌表达 [J].微生物学报,2005,45(2):218-222.

(收稿日期 2010-07-24)