

抗菌肽牛乳铁多肽素 (LfcinB)在毕赤酵母中的表达及活性鉴定

易俊波 黄德新 李凌云 林 枫*

(深圳国家生化工程技术开发中心 深圳 518057)

摘要: 利用巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 系统表达抗菌肽——牛乳铁多肽素 (bovine lactoferricin, 简称 LfcinB), 获得的分泌型表达产物具有较强的抗菌活性。首先将人工合成的 LfcinB 基因片段克隆到巴斯德毕赤酵母分泌型表达载体 pPIC9K中, 获得的重组质粒 pPIC9K-LfcinB通过限制性内切酶 SalI 酶切线性化, 经电穿孔法转化入毕赤酵母细胞 SMD1168内。G418抗性筛选, 得到高拷贝转化子, 经 PCR 检测 LfcinB 基因与毕赤酵母染色体稳定整合。阳性克隆经甲醇诱导表达 LfcinB。结果表明, 抗菌肽牛乳铁多肽素基因已经整合到酵母细胞基因组中并获得表达, 表达产物具有较强的杀菌作用。

关键词: 牛乳铁多肽素 (LfcinB), 基因, 表达载体, 毕赤酵母表达系统

中图分类号: Q782, Q784, Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 02-0265-05

Expression and Identification of LfcinB Gene in *Pichia pastoris*

YI Jun-Bo HUANG De-Xin LI Ling-Yun LIN Feng

(National Engineering Center for Biotechnology, Shenzhen 518057)

Abstract: In present study, bovine Lactoferricin was first secretly expressed in *Pichia pastoris* yeast expression system. The synthesized LfcinB gene fragment was cloned into expression vector pPIC9K, and then obtained recombinant plasmid, designated as pPIC9K-LfcinB, was linearized and transformed into *Pichia pastoris* strains SMD1168 by electroporation. The transformants were screened with Geneticin and multi-copy colonies were harvested, in which LfcinB gene was verified to inserted into yeast chromosome stably. The positive recombinant *Pichia strains* were induced with methanol to express LfcinB in culture supernatant. Its expressive products has high activity of killing bacteria. We concluded that LfcinB gene was cloned and integrated into yeast chromosomes, and obtained expression peptide was tested to have high antibacterial activity.

Key words: Bovine lactoferricin, Gene, Expression vector, *Pichia pastoris* yeast expression system

抗菌肽 (antimicrobial peptides) 是具有抗菌活性阳离子型短肽的总称, 与普通抗生素相比, 抗菌肽的“抗菌谱”更广, 热稳定性好, 无免疫原性, 部分抗菌肽能够抑制真菌、原虫、有包膜病毒的生长、繁殖, 甚至干扰肿瘤细胞的生长。

1975年瑞典科学家 Boman 等人从惜古比天蚕 (*Hyatophoracecropia*) 蛹中诱导分离得到一种杀菌肽, 并将其命名为 cecropin。此后, 许多抗菌肽相继被分离、纯化, 一些抗菌肽的氨基酸一级结构和基因序列得到确定。80年代, 有关抗菌肽的研究主要集中在大型的经济昆虫; 90年代以来, 在继续对大型经济昆虫进行研究的同时, 又扩展到一些小型昆虫和其它无脊椎及脊椎动物, 此后人们相继从细菌、真菌、两栖类、昆虫、高等植物、哺乳动物、直至人类体内, 发现了抗菌肽^[1]。目前, 抗菌肽已成为免疫学和分子生物学的又一个热点。

乳铁蛋白 (lactoferrin, LF) 1960年首先由

Groves从牛乳中分离获得, 广泛存在于乳汁、唾液、泪液等外分泌液或血浆、中性粒细胞中, 是一种具有多种生物学功能的蛋白质, 它不仅参与铁的转运, 而且具有抗微生物、抗氧化、抗肿瘤作用, 以及调节免疫系统的功能^[2], 被认为是一种新型的抗菌、抗肿瘤药物和极具开发潜力的食品、饲料添加剂。长期以来, 人们一直认为 LF 容易受热失活, 影响了其商业化的进程。但是 Horvath^[3]等的研究表明: 牛 LF 在酸性 pH 下, 其铁结合能力、抗原活性以及抗菌活性保持不变, 这些稳定的性质使其具有很好的市场开发前景。目前商业用途的 LF 均来自牛乳, 价格很高, 尽管如此, 在欧洲和日本, 牛 LF 已经进行商业化生产并用于制造母乳化婴儿奶粉或其它功能性食品。

LfcinB 是牛乳铁蛋白在消化道正常生理条件下释放出的一种抗菌肽^[4], 含 25 个氨基酸残基, 其一级结构为: F K C R R W Q W R M K K L G A P

*通讯作者 Tel: 0755-26631420

收稿日期: 2006-05-22, 修回日期: 2006-07-06

SITCVRRRAF^[5]。文献报道, 将 LfcinB 的特定氨基酸突变为 W, 其杀菌活性明显增强^[6]。LfcinB 的抑菌效果是牛乳铁蛋白的 400 倍^[7], 能在胃肠道中发挥更强的作用, 在水溶液中呈亲水脂的两个反向折叠结构, 具有耐热、在消化道中不易降解、无抗原性的特性, 能够调节免疫作用, 具有广谱抑菌作用, 同时不干扰肠道益生菌等特性。LfcinB 抗菌范围包括许多革兰氏阳性菌 (G+) 和革兰氏阴性菌 (G-) 病原菌, 例如大肠杆菌、肠炎沙门氏菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌等^[8,9], 但不作用于双歧杆菌等对人体有益的细菌, 同时还能刺激细胞生长、参与免疫调节。此外, 还发现 LfcinB 具有抑制及杀死多种真菌的作用^[10], 由于其具有特殊的作用和功能, 因此受到国外研究机构、制造厂商的重视。但抗菌肽分离纯化的制作成本高, 阻碍了抗菌肽的实际应用, 随着分子生物学特别是基因工程的迅速发展, 借助基因工程手段生产重组的具有抗菌活性的多肽成为一条可行的新途径。

本研究采用巴斯德毕赤酵母表达系统, 利用甲醇诱导, 尝试在酵母系统中表达具有抗菌活性的短肽。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒: 毕赤酵母菌 SMD1168 (his4, pep4)、大肠杆菌宿主菌 DH5 和毕赤酵母表达质粒 pPIC9K 由本实验室保存、金黄色葡萄球菌标准株 *S. aureus* [CMCC26003] 购自广东省深圳市药检所。

1.1.2 分子生物学试剂: OXO D 培养基 Tryp tone、Yeast extract、Mycological peptone 购自上海生工公司, 各种限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, 脱氧核苷三磷酸 (dNTP), Ex Taq DNA 聚合酶, *EcoR* 及 *Not* 购于大连宝生物公司, DNA 抽提试剂盒及 DNA 凝胶回收试剂盒购于德国 Qiagen 公司, DNA 标志物 DL2000, 十二烷基硫酸钠 (SDS-Na), Tris 碱及氨苄青霉素系上海生工生物工程公司产品, 蛋白质标志物购于美国 BioRad 公司, 氨基糖甙类抗生素 G418 购于美国 Invitrogen 公司, EPI-CENTRE 公司 MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit 试剂盒购于基因公司, 其余试剂均为进口或国产分析纯以上级产品。序列合成和 PCR 引物均为北京赛百盛基因技术有限公司合成。

培养基: YEPD、BMGY、BMMY、MD、MM 配方及相关操作见 Invitrogen 公司的 Pichia expression Kit 操作手册。

1.2 方法

1.2.1 序列合成及 PCR 引物的合成: 根据报道^[6], 并选择使用毕赤酵母偏好的密码子^[11]合成 LfcinB 全长序列:

FKCWRWQWRW KKL GAPSITCVRRRAF

设计上游引物为:

P1 5'-GGC GAA TTC T T C A A A T G T T G G A G A T-3

(引入 *EcoR* I)

设计下游引物为

P2 5'-GGC G C G G C C G C T T A A A A G G C T C T I C T A-3 (引入 *Not* I) .

1.2.2 LfcinB 基因的 PCR 扩增: 以合成的全长基因为模板, P1、P2 为一对引物, 进行 PCR 扩增, PCR 循环经 94 变性 4 min 后按以下条件扩增: 94 30s, 56 30s, 72 30s, 共 30 个循环; 最后 72 延伸 5 min。产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并回收纯化 PCR 产物, 将获得的 PCR 产物进行序列分析。

1.2.3 重组质粒的构建及鉴定: 分别用 *EcoR* 及 *Not* 双酶切 LfcinB 基因的 PCR 产物, 经琼脂糖凝胶电泳后, 回收并与同样经 *EcoR* 及 *Not* 双酶切的 pPIC9K 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5, 菌落 PCR 鉴定重组质粒, 并进一步通过限制性内切酶酶切鉴定 (图 1)。

1.2.4 重组表达质粒转化酵母: 在 100mL 三角瓶内放 10mL YEPD 培养基, 接种酵母宿主菌 SMD1168 单菌落, 30, 250r/min 培养过夜; 按 1:100 转接后, 继续培养过夜至 $OD_{600} = 1.3 \sim 1.5$, 4, 3000r/min 离心 5min, 分别用 100mL 及 50mL 预冷的无菌水洗涤 2 次, 用 25mL 预冷的 1mol/L 山梨醇溶液洗涤 1 次, 尽可能去除溶液, 用 200μL 预冷的 1mol/L 山梨醇溶液重悬菌体, 获得酵母感受态细胞。将获得的阳性重组质粒 pPIC9k-LfcinB 用 *Sal* 酶切线性化, 约 10~20μg 质粒 DNA 与 80ul 冷的酵母感受态细胞混合, 转入预冷的 0.2cm 电转移杯, 冰浴 5min, 于 1,500V、25μF、200 条件下电击, 迅速加入 1mL 冷的 1mol/L 山梨醇溶液, 混匀, 涂布于 MD 选择平板上, 30 培养 2~3d, 至转化子 (pPIC9K-LfcinB/SMD1168) 长出。

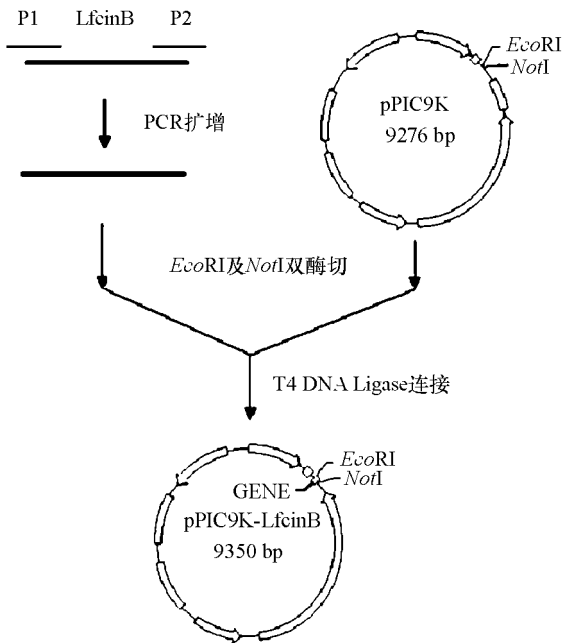


图 1 表达质粒 pPIC9K-LfcinB 构建示意图

1.2.5 G418高抗性的转化子的筛选及甲醇利用型鉴定: 用点种法鉴定酵母转子 (pPIC9K-LfcinB / SMD1168) 的 G418 抗性。依次用含 G418 浓度为 1、2、3、4 mg/mL 的 YEDP 平板进行筛选, 将筛选到的转化子单菌落对应地接种于 MD 和 MM 平板, 30 °C 培养 3~5d, 观察单菌落生长情况。

1.2.6 PCR检测 LfcinB 基因与毕赤酵母染色体基因组的整合 用 EPCENTRE 公司 MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit 提取酵母总 DNA 作为模板, 按照 Invitrogen 公司提供的方法 PCR 检测 LfcinB 基因与毕赤酵母染色体基因组的整合, 载体 pPIC9K 转化的毕赤酵母菌 (pPIC9K/SMD1168) 同上操作, 作为阴性对照。同时用重组质粒 pPIC9K-LfcinB DNA 作为阳性对照。

1.2.7 表达菌株的诱导表达: 接种具有高 G418 抗性且 PCR 鉴定阳性的单菌落于 25mL BMGY 培养基, 30 °C, 220~250r/min 振荡培养至 $OD_{600} = 2.0 \sim 4.0$, 4000r/min 离心 5min, 弃去培养基, 用 50~100mL BMMY 培养基重悬菌体, 使菌体浓度约 $OD_{600} = 1.0$, 30 °C, 220~250r/min 振荡诱导培养, 分别在诱导 0、12、24、36、48、60、72、84、96 h 取样, 每次取样 1mL; 所取样品 10000r/min 离心 2min, 将上清和菌体分别置 -80 °C 保存, 每 24h 补充甲醇一次, 使其终浓度始终维持为 1%。

1.2.8 抑菌圈法检测生物活性: 从金黄色葡萄球

菌的新鲜培养皿上挑取一单菌落, 于 3mL LB 培养基中, 37 °C, 300r/min 培养至 $OD_{560} = 0.3 \sim 0.5$ 。取 5 μ L 新鲜菌液加入 6mL 固体 LB 培养基中, 混匀后倒入培养皿中。然后用直径 2mm 的打孔器打孔, 每孔点样 5 μ L 发酵上清液, 同时以 0.01 mg/mL 的氨苄青霉素作抑菌活性对照, 以载体 pPIC9K 转化酵母菌 (pPIC9K/SMD1168) 的发酵上清液作阴性对照, 放于 37 °C 恒温培养箱中培养过夜, 观察抑菌活性, 测量抑菌圈的大小。

1.2.9 表达产物的浓缩处理及 SDS-PAGE 测定: 三氯乙酸 (TCA) 沉淀法将表达上清液浓缩 10 倍: 1mL 表达上清液中加入 100 μ L 100% 三氯乙酸振荡混匀, 冰浴中沉淀 30min, 10,000 \times g 离心 5min, 去上清, 再用 10% 三氯乙酸洗涤沉淀^[12], 经 16.5% 的 SDS-PAGE 检测表达产物。

2 结果

2.1 抗菌肽 LfcinB 基因的 PCR 扩增

PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示: 扩增出一条特异谱带, 大小约 100bp, 与预期的大小 (98bp) (基因碱基数加上引入的酶切位点和保护碱基数) 基本一致 (图 2), 进一步经序列测定证实为正确的 LfcinB 基因。

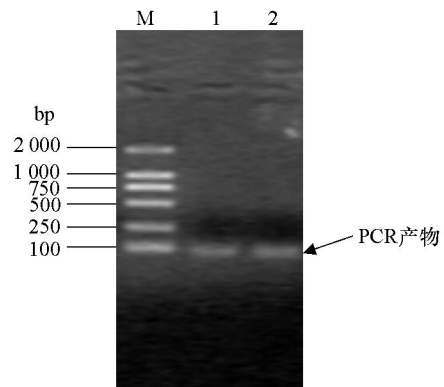


图 2 LfcinB 基因的 PCR 扩增

1、2 PCR 产物, M DNA marker

2.2 重组表达质粒的构建及鉴定

重组质粒经 *EcoR* 及 *NotI* 双酶切获得了大小约 80bp 的插入片段, 与预期结果一致, 证实约 80bp 的 LfcinB 基因已经克隆到 pPIC9K 载体中, 获得了阳性重组质粒 pPIC9K-LfcinB (图 3)。

2.3 G418 高抗性转化子筛选及甲醇利用型鉴定

将阳性重组质粒 pPIC9K-LfcinB 通过电穿孔法

转化入酵母菌 SMD1168 中，检测转化酵母菌的 G418 抗性，在 G418 浓度为 2 mg/mL 的 YDP 平板上获得 9 个 G418 高抗性的转化子，经甲醇利用型鉴定均为甲醇利用型 (Mut⁺) 转化子。

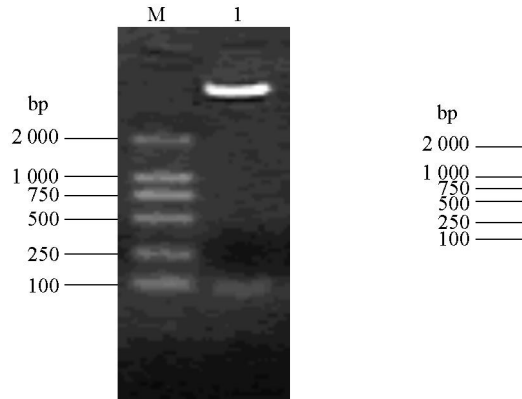


图 3 重组质粒 pPIC9K-LfcinB 的酶切鉴定
1 质粒 pPIC9K-LfcinB 经 EcoR + NotI 消化释放一条约 80bp 的谱带，M DNA marker

2.5 重组酵母菌发酵上清液的抑菌活性

9 株甲醇利用型 (Mut⁺) 转化子经甲醇诱导，获得的表达上清液进行抑菌活性检测，均出现抑菌活性，其中 2 号重组酵母菌的发酵上清抑菌圈最为清晰，说明其抑菌活性最强，而载体 pPIC9K 转化酵母菌 (pPIC9K/SMD1168) 的发酵上清液则无抑菌圈出现 (图 5)。

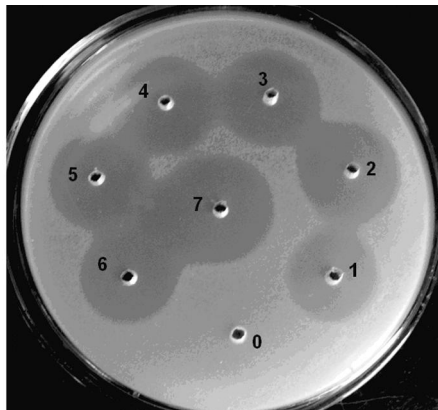


图 5 发酵上清的抑菌测定

0 阴性对照 (pPIC9K 空质粒转化子发酵上清)，1~6 2 号转化子在第 24, 36, 48, 60, 72, 84 h 的发酵上清，7 阳性对照 (0.01mg/mL 的氨基青霉素)

2.6 重组酵母菌发酵上清液 SDS-PAGE 检测

将上述抑菌活性最强的 2 号重组酵母菌的发酵上清液浓缩 10 倍后经 SDS-PAGE 分离检测，发现在约 3.6kD 处出现 1 条明显新生蛋白带，而载

2.4 酵母重组转化子的 PCR 鉴定

上述 9 个甲醇利用型 (Mut⁺) 酵母转化子经 PCR 鉴定，表明 9 株转化子中的抗菌肽 LfcinB 基因已经整合到酵母细胞 SMD1168 的染色体中 (图 4)。

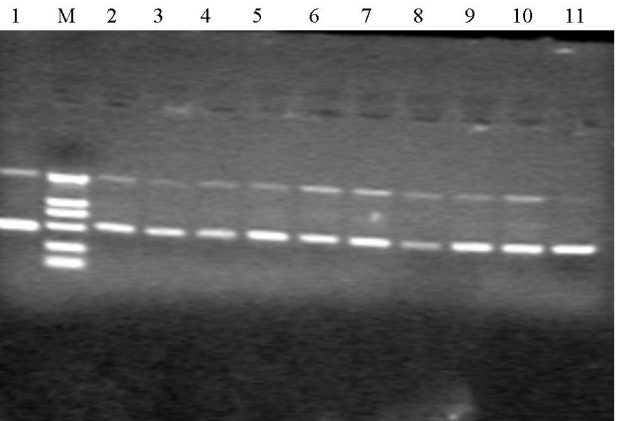


图 4 酵母重组转化子的 PCR 鉴定

1 阳性对照 (质粒 pPIC9K-LfcinB DNA 的 PCR 产物)，2~10 含有质粒 pPIC9K-LfcinB 的酵母转化子的 PCR 产物，11 阴性对照 (未插入基因的空载体酵母转化子的 PCR 产物，M DNA marker)

体 pPIC9K 转化的酵母菌经发酵获得的上清液在相应位置未见蛋白带 (图 6)，可断定此处表达蛋白带为 2 号重组酵母菌的特征性表达带。

3 讨论

在本实验的设计上，我们根据酵母系统中分泌型表达载体 pPIC9K 的多克隆位点，设计了一对引物 (p1, p2)，其 5 端和 3 端含有酶切位点 EcoR 及 NotI，将合成 LfcinB 的基因克隆至载体，经测序分析正确，用 SalI 酶切线性化质粒 DNA，电穿孔法转化酵母宿主菌 SMD1168，筛选到 G418 高抗性的转化子，进一步鉴定得到甲醇利用型 (Mut⁺) 转化子，提取酵母菌总 DNA 用 PCR 法鉴定，结果证明 LfcinB 基因稳定地整合到毕赤酵母染色体基因组中，对诱导表达的不同时间进行取样，将表达上清进行抗金黄色葡萄球菌的抑菌活性实验，得到一株有抑菌活性表达产物的重组菌，通过浓缩 10 倍后在 SDS-PAGE 胶上能清楚看到蛋白带。由于实验室的发酵规模有限，表达量较低，目前正在对发酵的条件进一步优化。

通过基因工程的方法克隆、表达抗菌肽基因有不少成功的报道，Reichhart 等^[13]在酵母中成功表达了具有正确二硫键配对的绿蝇 defensin A，产量最高可达每 mL 培养基 2.5 μg；Andersons 等^[14]利用昆虫病毒表达系统表达了 cecropinA 的融合蛋

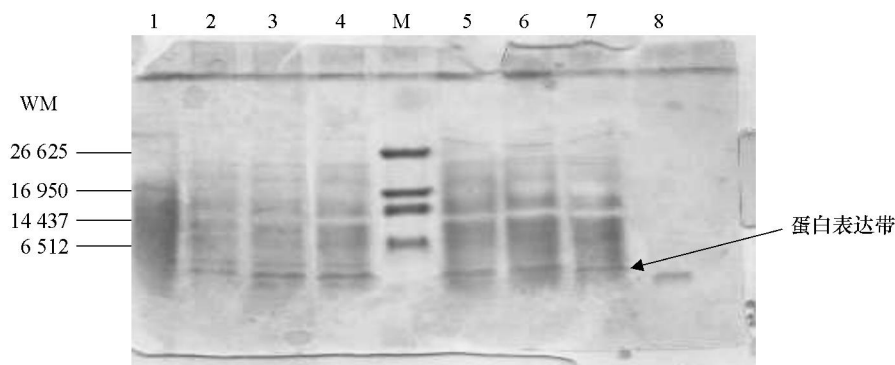


图 6 发酵上清的 SDS-PAGE电泳图

1 阴性对照 (载体 pPIC9K转化的酵母发酵上清液), 2~7 号转化子在第 24, 36, 48, 60, 72, 84h的发酵上清液, 8 对照蛋白 (3.4kD), M 蛋白质 marker

白; 国内黄亚东等^[15]等人也成功表达了不同的抗菌肽基因, 但关于基因工程方法表达畜禽抗菌肽的报道甚少, 所以, 运用基因工程技术表达畜禽抗菌肽, 从而提高畜禽养殖动物的抗病能力, 将对在畜禽饲养中减少甚至替代抗生素的使用起到积极的促进作用。

目前不少病原菌对现有抗生素逐步产生耐药性, 而具有广谱抗菌且有独特抗菌机制的抗菌肽在这方面具有明显优势, 随着对抗菌肽结构与活性的关系、抗菌肽作用机制及其基因表达调控机制认识的不断深化, 设计高效的、有利于人类健康的抗菌肽作为抗生素替代品是完全可行的。

参考文献

- [1] Robert E W H. The Lancet infectious Diseases, 2001, 1: 156~164.
- [2] Bück J. Immunology Today, 1995, 16 (9): 417~419.
- [3] Horaki A. J Dairy Sci, 1991, 74 (1): 65~71.
- [4] Bellamy W. Biochem Biophys Acta, 1992, 1121 (2): 130~136.
- [5] 汪以真, 胡迎利, 许梓荣. 中国畜牧杂志, 2003, 39 (3): 53~54.
- [6] Teraghuai S. Biochem Cell Biol, 2002, 80: 65~74.
- [7] 王飞. 广东饲料, 2004, 13 (4): 21~23.
- [8] Elizabeth J D. Digestive Diseases and Sciences. 1998, 43 (12): 2573~2812.
- [9] Pyong W P, Gerald B P, Michael T H, et al. Nature, 2000, 411: 98~102.
- [10] 黄海青, 薛建军. 饲料博览, 2003, 7: 9~11.
- [11] 赵翔, 霍克克, 李育阳. 生物工程学报, 2000, 6 (3): 308~311.
- [12] Hames B D. Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach. In: Hames B D, Rickwood D, eds. London: RL Press Limited, 1981, 290.
- [13] Reichhart J M, Petit I, Legrain M, et al. Invert Peptid Dev, 1992, 21: 15~24.
- [14] Andersons D, Engstm A, Josephson S, et al. Biochem J, 1991, 280: 21~24.
- [15] 黄亚东, 郑青, 黄自然, 等. 华南理工大学学报 (自然科学版), 2002, 30 (2): 13~16.

稿件规范化与标准化

论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} , 不用大写 X , 也不用 *Mean*。标准差用英文小写 s , 不用 *SD*。标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$, 不用 *SE*。t检验用英文小写 t 。F检验用英文大写 F 。卡方检验用希文小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。