

兔防御素基因在毕赤酵母中的串联表达 及抑菌机理研究

李霞¹, 刘霭珊¹, 徐来祥², 赵亚华¹

(1 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642; 2 曲阜师范大学 生命科学学院, 山东 曲阜 273165)

摘要:根据毕赤酵母 *Pichia pastoris* 密码子偏爱性重编兔防御素基因 (Neutrophils peptide-1, pNP-1), 设计4条引物搭桥合成。将 pNP-1 克隆到 pPICZ α -A 载体, 使用同尾酶 *Xho* I 和 *Sal* I 在重组载体上构建多价串联体 [pNP-1 (2 $\times$)] 和 [pNP-1 (3 $\times$)], 分别对这3个基因进行毕赤酵母表达, 表达量依次为 3.39、6.39 和 13.05 $\mu\text{g/mL}$ 。重组蛋白经溴化氢切割后, 对得到的活性产物进行抑菌试验, 结果表明, 重组 pNP-1 蛋白对苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis* 等革兰阳性菌 (G^+) 及大肠埃希菌 *Escherichia coli* 等革兰阴性菌 (G^-) 均有抑菌活性, 但对白色念珠菌 *Candida albicans* 等真菌没有明显的抑菌活性。对 pNP-1 抑菌机理研究发现, 细胞壁和 DNA 合成抑制剂对 pNP-1 抑菌活性有协同作用, 而多种蛋白质和 RNA 合成抑制剂对 pNP-1 抑菌活性有抑制作用。

关键词:兔防御素基因; 毕赤酵母; 串联表达; 抑菌机理

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2011)04-0057-06

Tandem Expression of Rabbit Defensin Gene in *Pichia pastoris* and Tentative Study on the Antibacterial Mechanism

LI Xia¹, LIU Ai-shan¹, XU Lai-xiang², ZHAO Ya-hua¹

(1 College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China)

Abstract: Rabbit defensin gene pNP-1 was reconstructed according to codon preference of *Pichia pastoris* and then amplified by four specific primers. After pNP-1 cloned to pPICZ α -A vector, multiple copies of the pNP-1, [pNP-1 (2 $\times$)] and [pNP-1 (3 $\times$)] were constructed by using isocaudarmer *Xho* I and *Sal* I on the recombinant vector. The recombinants pNP-1, [pNP-1 (2 $\times$)] and [pNP-1 (3 $\times$)] were expressed by *Pichia pastoris*, with an expression of 3.39, 6.39 and 13.05 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The cleavage of recombinant protein performed by cyanogen bromide, the antibacterial activity of the resultant product was examined by antibacterial test. The results showed that recombinant protein pNP-1 had a remarkable antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria such as *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli*, but no antibacterial activity against fungi. Further study of the antibacterial mechanism of pNP-1 showed that cell-wall synthesis inhibitors and DNA synthesis inhibitors had obvious synergistic effect on antibacterial activity of pNP-1, while protein synthesis inhibitors and RNA synthesis inhibitors had certain inhibition to antibacterial activity of pNP-1.

Key words: rabbit defensin gene; *Pichia pastoris*; tandem expression; antibacterial mechanism

收稿日期: 2010-10-25

作者简介: 李霞 (1986—), 女, 硕士; 通信作者: 赵亚华 (1955—), 女, 教授, E-mail: zhaoyahua@126.com; 徐来祥 (1960—), 男, 教授, E-mail: xulx@mail.qfnu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30770317); 济宁市重大科技专项 (济科技[2006]011)

哺乳动物防御素具有广泛的抗性谱,可以抗细菌、真菌、被膜病毒,甚至对支原体、衣原体、螺旋体及肿瘤细胞和爱滋病病毒也有杀伤作用^[1-2]。此外,防御素还可启动获得性免疫系统,因此越来越受到人们的关注。哺乳动物的免疫系统包括特异性和非特异性免疫。非特异性免疫对各种入侵机体内的微生物在最初反应中起关键作用,哺乳动物防御素(Defensins)是其非特异性免疫的主要成分,存在于多形核粒细胞和上皮组织内,如人、大鼠、豚鼠、兔的嗜中性粒细胞及人和小鼠的小肠潘氏细胞内^[3]。防御素富含 Cys,在分子内形成二硫键,根据其分子内二硫键的连接位置不同可分为 α -防御素和 β -防御素^[4]。 α -防御素由29~36个氨基酸(aa)组成,分子内含6个保守半胱氨酸形成的3对二硫键,连接位点分别为Cys1-Cys6、Cys2-Cys4和Cys3-Cys5^[5]。二硫键可使小分子防御素分子致密以防蛋白酶水解,致使防御素在吞噬溶酶体环境中能保持活性。在兔中性粒细胞(Rabbit neutrophil peptide, NP)中分离到6种 α -防御素的阳离子抗菌肽:NP-1、NP-2、NP-3a、NP-3b、NP-4、NP-5,长度均约32-34个aa,富含Cys和Ary,每种防御素都含3个分子内二硫键。比对它们的aa组成,其序列高度保守,对其生物学活性及结构有重要的作用。2003年徐文生等^[6]对NP-1进行过原核表达,表达量占细菌总蛋白的34.7%。本研究采用毕赤酵母 *Pichia pastoris* 表达系统对pNP-1基因及其串联基因进行表达,表达出的多价串联体的重组蛋白经溴化氰切割,将得到的产物进行抑菌试验,初步研究兔防御素的抑菌机理。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

Pichia pastoris GS115 菌株、pPICZ α -A 质粒购于 Invitrogen 公司;常规克隆宿主菌大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α ,抗菌活性检测菌株大肠埃希菌 K₁₂ D₃₁、白色念珠菌 *Candida albicans*、灵菌 *Serratia marcescens*、枯草杆菌 *Bacillus subtilis*、金黄葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 及苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis* 均由华南农业大学生命科学学院生化实验室保存。

1.2 酶与试剂

Taq DNA 聚合酶,CIAP 碱性磷酸酶,T₄ DNA 连接酶,限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I、*Xho* I、*Sac* I 购自大连宝生物工程公司;肠激酶购自 NOVAGEN 公司;质粒小提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司;Zeocin、PVDF 超滤膜和 ProBond

蛋白纯化试剂盒购自 Invitrogen 公司;引物合成及测序由上海英骏生物公司完成;其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 pNP-1 基因及其串联基因的设计

根据毕赤酵母密码子偏爱性重编兔防御素基因后的 pNP-1 基因序列:5'-CGCGAATTCGTCGTCTGTGCTTGTAGAAGAGCTTTGTGTTTGCCAAGAGAAAGAAGAGCTGCTTTCTGTAGAATCAGAGGTAGAATCCACCCATTGTGCTGCAGAAGAGCTCGACCGC-3' (下划线为 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切位点)。根据已调整的 pNP-1 序列,使用 Primer Priemir 5.0 设计4条搭桥引物 pNP-1 (1)、pNP-1 (2)、pNP-1 (3)和 pNP-1 (4),用于合成 pNP-1 序列。

利用 PCR 的方法在 pNP-1 基因5'端加上 *Xho* I 酶切位点及蛋氨酸密码子 ATG,在3'端加上 *Sal* I 酶切位点,合成 pNP-1 的串联基因 [pNP-1 (2 $\times$)] 和 [pNP-1 (3 $\times$)]。引物序列见表1。

表1 引物序列

Tab. 1 List of primers

引物名称	序列(5'→3')
pNP-1 (1)	CGCGAATTCGTCGTCTGTGCTTGTAGAAGAGCTTTGTG
pNP-1 (2)	TCTACAGAAACCAGCTCTTCTTTCTCTTGGCAAACACAAAGCTCTTCTAC
pNP-1 (3)	AGAAGAGCTGTTTCTGTAGAATCAGAGGTAGAATCCACCCATTGTGCTG
pNP-1 (4)	GCGGTGCACTCTTCTGCAGCACAAATGGGTGIGATTCTAC
正向串联引物	CGGCTCGAGATGGTCTGTGCTGTGT
反向串联引物	CCGGTCGACCATTTCTTTCGAGCACAA
AOX I 检测引物	GACTGGTTCCAATTGACAAGC

1.4 pNP-1 基因与其串联基因的合成与扩增

1.4.1 pNP-1 基因的合成及重组质粒 pPICZ α -pNP-1 的构建 4条搭桥引物作为模板进行 PCR,PCR 循环参数:94℃ 2 min, 94℃ 30 s、52℃ 30 s、72℃ 40 s 进行25个循环,72℃ 2 min。取上步产物作为模板,用 pNP-1 (1) 和 pNP-1 (4) 为引物进行第2次 PCR 扩增,程序为:94℃ 2 min,94℃ 30 s、52℃ 30 s、72℃ 40 s 进行25个循环,72℃ 10 min。琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化后得到 pNP-1 基因。

将 pNP-1 基因与载体 pPICZ α -A 均经 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切后回收,连接,转化 *E. coli* DH5 α 。将此克隆的重组质粒命名为 pPICZ α -pNP-1。用 AOX I 和 pNP-1 (1) (表1) 作为引物进行菌落 PCR 检测。

1.4.2 pNP-1 串联基因的合成 以 pPICZ α -A-pNP-1

重组质粒为模板,将 pNP-1 基因串联的正向和反向引物(表1)进行 PCR 反应合成串联基因 pNP-1 (2×),以此类推得到 pNP-1 (3×). PCR 反应程序:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s 进行 25 个循环,72 ℃ 10 min. 琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化后得到 pNP-1 (2×) 和 pNP-1 (3×).

1.4.3 pNP-1 多价串联重组质粒的构建 pPICZaA-pNP-1 重组质粒经 *Sac* I 单酶切消化后 CIAP 去磷酸化;pNP-1 串联基因经 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切,连接转化 *E. coli* DH5 α . 将此双拷贝重组质粒命名为 pPICZaA-pNP-1 (2×). 同样在 pPICZaA-pNP-1 (2×) 基础上构建 pNP-1 三拷贝基因重组质粒 pPICZaA-pNP-1 (3×).

1.5 多倍体酵母重组质粒的构建

3 种重组质粒分别经 *Sac* I 酶切线性化. 电转毕赤酵母 GS115 感受态细胞(2.0 kV, 25 μ F, 200 Ω). 30 ℃ 培养 72 h. 重组质粒使用 AOX I 和 pNP-1 (4) 通过菌落 PCR 鉴定. PCR 反应程序:94 ℃ 10 min, (94 ℃ 30 s, 50 ℃ 30 s, 72 ℃ 50 s) 30 个循环, 72 ℃ 10 min. 产物进行 10 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳观察鉴定.

1.6 重组酵母诱导表达后重组蛋白检测及纯化

分别选取生长最旺盛的 3 种重组酵母菌进行甲醇诱导表达. 挑取单菌落接种于 BMGY 培养基中,诱导培养 72 h 后停止,离心收集上清,使用三氯乙酸(TCA)沉淀法初步浓缩上清,Tricine-SDS-PAGE 检测. 大量表达重组蛋白使用硫酸铵沉淀法沉淀,取沉淀溶解. 将溶解后的样品使用 Sephadex-G25 凝胶过滤脱盐. 对于多倍体重组蛋白而言,上述操作后还需进行镍柱纯化. 纯化样品经 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳检测.

1.7 单体与多倍体裂解后的蛋白抑菌效价测定

将 1.6 得到的多倍体重组蛋白使用 CNBr 进行特异水解,冷冻干燥备用抑菌试验.

1.7.1 琼脂扩散法和稀释法测定抑菌效价 取纯化后的单体蛋白和多倍体裂解后样品,加 ddH₂O 溶解备用. 制备指示菌(金黄葡萄球菌,大肠埃希菌 K₁₂ D₃₁,枯草杆菌,苏云金杆菌、白色念珠菌、灵菌)菌悬液. 配制 LB 及 PDA 半固体培养基平板. 分别取菌悬液 200 μ L 涂布于相应的半固体平板上. 待平板完全吸收菌液后,取灭菌的滤纸片放置在平板上,分别浸润 5、10、20 和 40 μ L 的样品,待样品溶液被平板完全吸收后,放置于 37 ℃ 培养 12 h. 观察抑菌情况.

取琼脂糖扩散法中菌悬液,10 倍倍比稀释 10⁹ 倍,取 5、10、15、20 和 25 μ L 涂布固体培养基,记录各

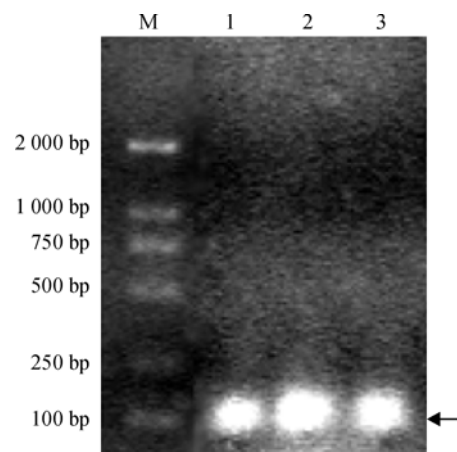
板生长的菌落数,计算出菌液的每毫升单位菌落总数(CFU/mL). 此外,将菌悬液稀释至 10⁵ CFU/mL,分别取 50 μ L 于 96 孔板,加入样品液 0、2、4、6、8 和 10 μ L,再加入无菌水补至 10 μ L 总体积,37 ℃ 培养 2 h 全部取出涂布半固体平板,37 ℃ 过夜. 计算平板上生长的菌落,算出细菌存活率.

1.7.2 多种抗生素对 pNP-1 抗金黄葡萄球菌抑菌效价的影响 取氨苄青霉素、链霉素、氯霉素、卡那霉素、利福平、新生霉素和四环素,用上述各抗生素的 5 倍最低抑菌浓度^[6],对处于对数生长期(10⁷ CFU/mL)的金黄葡萄球菌处理 1 h,离心沉淀菌体,用 PBS 洗净,并用 LB 培养基稀释菌液至 10⁵ CFU/mL,分别取 50 μ L 稀释后菌液于 96 孔板,加入在菌悬液 0、2、4、6、8 和 10 μ L,补水至 10 μ L 总体积,37 ℃ 培养 2 h 后测定细菌存活率. 以未用抗生素处理的菌体作对照.

2 结果与分析

2.1 pNP-1 单基因的合成

pNP-1 单基因的 PCR 扩增,电泳如图 1 所示,第 1、2、3 泳道均有一条约 100 bp 的电泳谱带,与预期的 pNP-1 基因大小 117 bp 相符.



M 为 DNA Marker;1、2、3 为 pNP-1 PCR 合成片段.

图 1 pNP-1 基因的 PCR 合成

Fig. 1 PCR amplification of pNP-1 gene

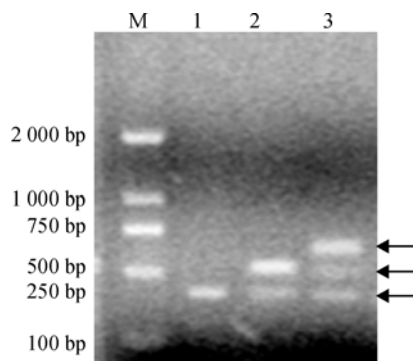
2.2 3 种重组质粒的 PCR 鉴定

3 种重组质粒转化 DH5 α 的单菌落进行菌落 PCR,电泳结果见图 2. 泳道 1、2、3 分别与 pNP-1、pNP-1 (2×) 和 pNP-1 (3×) 的预期大小 456、556 和 656 bp 相符,说明重组质粒中存在有不同拷贝数的目的片段.

2.3 pNP-1 及其重组子重组酵母的菌落 PCR 鉴定

3 个基因转化 GS115 后长出的酵母单菌落 PCR 后电泳结果如图 3. 3 个基因重组酵母与其重组 DH5 α 的菌落 PCR 结果基本一致,说明重组质粒已

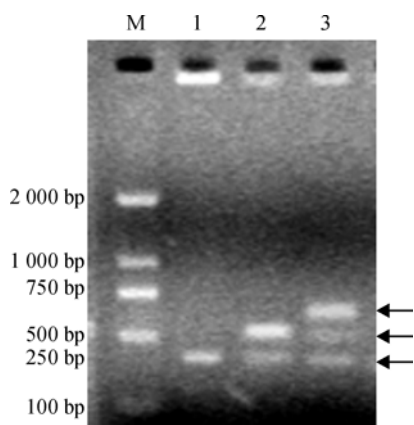
经成功整合进入酵母基因组中。



M 为 DNA Marker; 1、2、3 分别为 pNP-1、pNP-1 (2 ×)、pNP-1 (3 ×) 重组大肠埃希菌菌落 PCR 产物。

图2 pNP-1 及其多串联体重组子转化大肠埃希菌后的菌落 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of pNP-1, pNP-1 (2 ×) and pNP-1 (3 ×) recombination plasmids by PCR in *Escherichia coli*



M 为 DNA Marker; 1、2、3: 分别为 pNP-1、pNP-1 (2 ×)、pNP-1 (3 ×) 重组酵母菌落 PCR 产物。

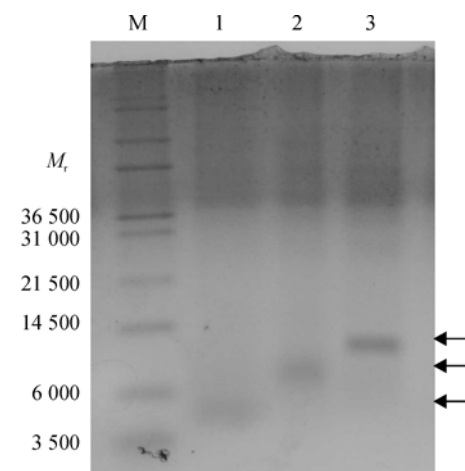
图3 pNP-1 及其多串联体重组子转化 GS115 后的菌落 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of pNP-1, pNP-1 (2 ×) and pNP-1 (3 ×) by colony PCR in GS115

2.4 pNP-1 重组酵母的甲醇诱导表达

对诱导表达的重组蛋白进行 Tricine-SDS-PAGE, 结果见图4, pNP-1、pNP-1 (2 ×) 和 pNP-1 (3 ×) 重组蛋白相对分子质量 (M_r) 约与 Marker 上 5 000、9 000 和 13 000 相对应, 与其重组蛋白的理论 M_r 5 490、9 380、13 270 大小基本相符。

用 Bandscan 5.0 软件计算 pNP-1、pNP-1 (2 ×) 和 pNP-1 (3 ×) 重组蛋白的表达量分别为 21.6%、30.7% 和 41.8%。表达上清液经考马斯亮蓝 G250 法测定总蛋白质量浓度分别为 15.7、20.8 和 31.2 mg/L, 总体积为 100 mL。由此得知重组蛋白在发酵液中的质量浓度分别为 3.39、6.39 和 13.05 $\mu\text{g/mL}$ 。

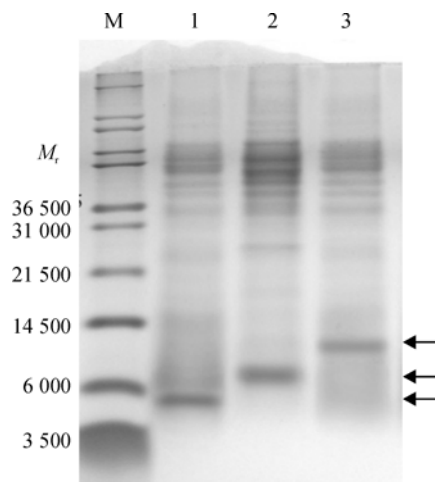


M 为蛋白质相对分子质量标准; 1、2、3 分别为酵母表达 pNP-1、pNP-1 (2 ×)、pNP-1 (3 ×) 产物。

图4 重组酵母的甲醇诱导表达
Fig. 4 Induced expression of pNP-1, pNP-1 (2 ×) and pNP-1 (3 ×) by methanol in recombinant GS115

2.5 pNP-1 重组蛋白的浓缩与纯化

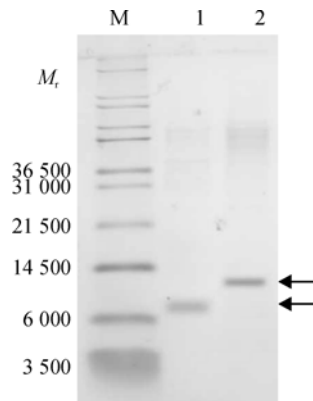
2.5.1 硫酸铵沉淀浓缩重组蛋白 硫酸铵沉淀浓缩后的 pNP-1、pNP-1 (2 ×) 和 pNP-1 (3 ×) 进行 Tricine-SDS-PAGE 后结果如图5所示。重组蛋白条带单一, 与 Marker 上 M_r 约 5 000、9 000 和 13 000 的条带相对应, 与其重组蛋白的理论值相符。



M 为蛋白质相对分子质量标准; 1、2、3 分别为硫酸铵浓缩后的 pNP-1、pNP-1 (2 ×)、pNP-1 (3 ×) 蛋白。

图5 硫酸铵沉淀浓缩后的重组蛋白电泳图
Fig. 5 Tricine-SDS-PAGE of recombined protein concentrated by ammonium sulfate

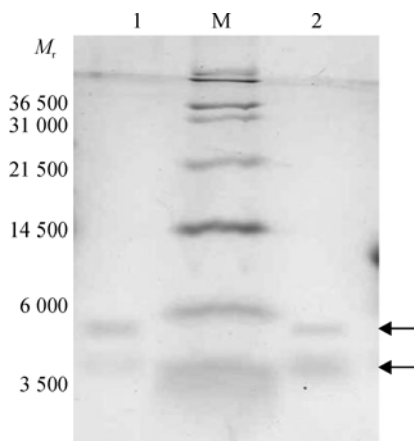
2.5.2 pNP-1 多倍体重组蛋白的 Ni 柱纯化 pNP-1 (2 ×) 和 pNP-1 (3 ×) 重组蛋白经 Ni 柱纯化后电泳结果如图6所示, 纯化后的 pNP-1 (2 ×)、pNP-1 (3 ×) 重组蛋白基本只剩下 M_r 为 9 000 和 13 000 的组分, 与预期大小相符。



M 为蛋白质相对分子质量标准;1、2 分别为 pNP-1 (2 ×)、pNP-1 (3 ×) 纯化后的重组蛋白。

图6 纯化的 pNP-1 (2 ×) 和 pNP-1 (3 ×) 重组蛋白电泳图
Fig.6 Tricine-SDS-PAGE of purified recombinant pNP-1 (2 ×) and pNP-1 (3 ×)

2.5.3 多倍体重组蛋白的 CNBr 特异水解 经 CNBr 水解后冻干的 pNP-1 (2 ×) 和 pNP-1 (3 ×) 重组蛋白溶于 ddH₂O, 电泳结果如图 7 所示。由图 7 可见, 出现了 M_r 约为 3 800 和 5 000 的 2 条带。其中 M_r 约为 5 000 的带较浅, 为带有表达载体上 1 600 bp 的 pNP-1 重组蛋白, M_r 约为 3 800 的带为 CNBr 水解下来的 pNP-1 蛋白。



M 为蛋白质相对分子质量标准;1、2 分别为 CNBr 水解后的 pNP-1 (2 ×) 和 pNP-1 (3 ×) 重组蛋白。

图7 水解 [pNP-1 (2 ×)]、[pNP-1 (3 ×)] 重组蛋白纯化电泳图

Fig.7 Tricine-SDS-PAGE of hydrolyzation of recombined pNP-1 (2 ×) and pNP-1 (3 ×) by cyanogen bromide

2.6 重组 pNP-1 的抑菌试验结果

琼脂糖扩散法抑菌试验结果显示, pNP-1 对苏云金杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌等 G⁺ 和大肠埃希菌 K₁₂D₃₁ 等 G⁻ 细菌均有明显的抑菌作用, 而对白色念珠菌没有抑菌作用, 对灵菌有轻微的抑菌作用。取琼脂糖扩散法试验中的孢子悬液 10 倍倍比稀释后得到的菌液做指示菌存活率试验, 得到的 pNP-1 质

量浓度与指示菌存活率关系如图 8 所示, 该图中显示的结果与琼脂糖扩散法抑菌试验结果相符合。

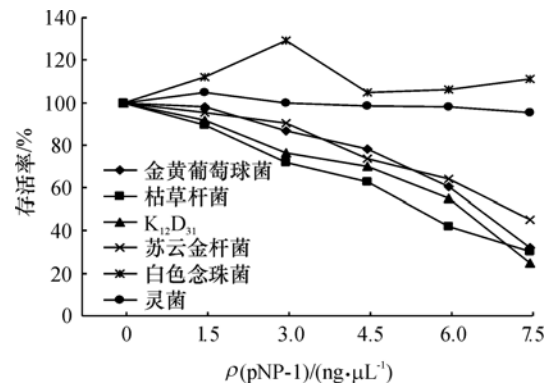


图8 pNP-1 质量浓度与指示菌存活率的关系
Fig.8 The relationship between pNP-1 mass concentration and survival rate of indicator bacteria

经过抑菌数据的线性回归分析, pNP-1 对各菌的最小抑菌质量浓度分别为金黄色葡萄球菌 8.59 μg/mL, 枯草杆菌 8.13 μg/mL, K₁₂D₃₁ 8.46 μg/mL, 苏云金杆菌 10.63 μg/mL。

2.7 不同抗生素处理对重组 pNP-1 抑菌活性的影响

将经氨苄青霉素、氯霉素、链霉素、卡那霉素、新生霉素、四环素和利福平处理过的金黄色葡萄球菌与不同浓度的 pNP-1 作用, 得到 7 种抗生素对 pNP-1 抑菌活性影响的数据, 如表 2 所示。细胞壁合成抑制剂氨苄青霉素处理后再培养 2 h 的金黄色葡萄球菌的存活率比对照组下降了 48.7%, 添加了重组 pNP-1 之后, 存活率比对照组平均下降了 45.9%, 说明 pNP-1 与氨苄青霉素都对金黄色葡萄球菌有抑制作用, 两者之间的抑菌表现出同促效应。蛋白质合成抑制剂卡那霉素、氯霉素、链霉素和四环素处理 2 h 后的金黄色葡萄球菌的存活率分别下降了 59%、13%、28%

表2 不同抗生素处理过的金黄色葡萄球菌在不同质量浓度重组 pNP-1 蛋白下的存活率

Tab.2 Survival rates of different antibiotic-treated *Staphylococcus aureus* under different mass concentrations of recombinant pNP-1 protein

$\rho(\text{pNP-1})/(\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1})$	对照	氨苄青霉素	卡那霉素	氯霉素	链霉素	四环素	新生霉素	利福平
0	100.00	52.30	41.00	87.00	72.00	59.20	86.00	74.20
1.5	98.20	44.60	34.20	89.40	72.40	52.30	80.70	64.30
3.0	86.50	37.50	35.70	84.90	77.60	54.70	82.10	49.10
4.5	78.30	21.50	40.70	81.20	72.00	51.80	79.50	35.40
6.0	60.70	17.30	43.80	76.80	68.00	58.10	84.20	26.70
7.5	32.10	5.40	32.40	70.20	62.90	50.60	81.10	11.60

和40.8%,再加入pNP-1处理后存活率均没有出现显著的下降,说明多种蛋白质合成抑制剂与pNP-1在抑菌方面没有明显的关系。RNA合成抑制剂利福平处理组的数据显示,重组pNP-1对利福平产生同促效应。DNA合成抑制剂新生霉素处理组,经过不同浓度的重组pNP-1处理后,细菌存活率最大下降值为6.5%,与对照组相比其下降幅度较小。2种核酸合成抑制剂对重组pNP-1表现不同的效应。

3 讨论

围绕兔防御素基因的表达,本研究实施了一系列有利于该基因表达的策略。目的基因中含过多的稀有密码子被认为是低表达水平和产生不完全产物的一個原因^[7-8]。尽管少量稀有密码子的出现通常不会给目的蛋白的合成造成太大影响,但如果一个基因中含有成串或多个稀有密码子,外源蛋白的表达水平将非常低。当在氨基端附近出现多个稀有密码子时,情况更为严重^[9]。根据毕赤酵母表达偏爱性优化最适合表达的pNP-1基因,设计引物人工搭桥合成,使用同尾酶构建多串联体在毕赤酵母中表达,明显提高了重组蛋白的表达量。1996年Lee等^[10]为扩大NP-1基因的表达量,尝试使用*E. coli*表达各种的融合串联多肽,这一方法使多肽的表达有显著提高,但表达量的增加并未与串联数的增长成正相关,特别是当串联数较大时,串联体的表达量反而降低。

限于试验条件,本研究对于pNP-1在毕赤酵母系统中的表达的所有数据都由摇瓶发酵获得,而培养温度、通气量、培养基酸碱度、培养密度等培养条件对表达量均有重要的影响,这些因素只有在发酵罐发酵的条件下才能得到严格控制,因此pNP-1基因的毕赤酵母发酵表达的过程仍有待进一步的优化。

很多研究都表明其作用位点不局限于只对细菌的膜结构,而更多是参与抑制细菌中核酸和蛋白合成的过程^[11-14]。同时,也有研究^[15-16]表明,防御素对细菌细胞膜的作用只是其整个抑菌过程的第1步,通过在细菌膜上形成穿孔或增加膜的通透性使其更容易进入细胞内部,并与细胞内的其他作用位点相互作用而进一步抑制细菌的生长。不同的抗生素有其特异的作用位点,对于防御素的作用机制,这也在本试验中有所体现,但其具体作用机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 韩玉萍,翟朝阳. 抗菌肽的抗肿瘤作用[J]. 生命的化学, 2006, 26(2):12-16.
- [2] 朱元军. 防御素抗HIV作用[J]. 国际病毒学杂志, 2006, 13(1):12-20.
- [3] 王伯瑶,吴琦. 内源性抗生素肽—天然免疫的介质[J]. 生命科学, 1999, 11(64):41-52.
- [4] GANZ T. Defensins: Antimicrobial peptides of vertebrates[J]. C R Biol, 2004, 327(6):539-549.
- [5] ENNO K, KNUT A, AXEL S. Synthesis and structure-activity relationship of β -defensins, multi-functional peptides of the immune system[J]. J Pept Sci, 2006, 12(4):243-257.
- [6] 徐文生,许杨. 兔防御素 NP1 在大肠杆菌中的表达[J]. 南昌大学学报:理科版, 2003, 27(3):295-298.
- [7] SORENSON M A, KURLAND C G, PEDERSON S. Codon usage determines translation rate *E. coli*[J]. Mol Biol, 1989, 207(2):365-377.
- [8] ZHANG Chun-ting, ZHANG Ren. Analysis of distribution of bases in the coding sequences by a diagrammatic technique[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(22):6313-6317.
- [9] CHEN Gia-fen, INOUE M. Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the *Escherichia coli* genes[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(6):1465-1473.
- [10] LEE J H, SKOWRON P M, RUTKOWSKA S M, et al. Sequential amplification of cloned DNA as tandem multimers using class-IIS restriction enzymes[J]. Genet Anal, 1996, 13(6):139-145.
- [11] XIONG Yan-qiong, YEAMAN M R, ARNOLD S. *In vitro* antibacterial activities of platelet microbicidal protein and neutrophil defensin against *S. aureus* are influenced by antibiotics differing in mechanism of action[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(5):1111-1117.
- [12] FRIEDRICH C L, DIANNE M, BEVERIDGE T J, et al. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(8):2086-2092.
- [13] BROGDEN K A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? [J] Nat Rev Microbiol, 2005, 3(3):3238-3250.
- [14] DHOPE V, KRUKEMEYER A, RAMAMOORTHY A. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1758(9):1499-1512.
- [15] SAHL H G, PAG U, BONNESS S. Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity[J]. J Leukoc Biol, 2005, 77(4):466-475.
- [16] LEHRER R I. Multispecific myeloid defensins[J]. Curr Opin Hematol, 2007, 14(1):16-21.